

Aus dem Institut für Ernährungswissenschaft
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Professor Dr. med. H. D. Cremer

Beeinflussung enzymatischer Reaktionen durch Sulfid und Thiamin in vitro und in vivo

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Landwirtschaftlichen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

vorgelegt von
Jemima Ustane Laryea
aus Accra, Ghana

Gießen 1970



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545905_0012

Aus dem Institut für Ernährungswissenschaft
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Professor Dr. med. H. D. Cremer

Beeinflussung enzymatischer Reaktionen durch Sulfit
und Thiamin in vitro und in vivo

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Landwirtschaftlichen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

vorgelegt von
Jemima Ustane Laryea
aus Accra, Ghana

Gießen 1970

D e k a n : Professor Dr. F. Großmann

1. Berichterstatter: Professor Dr. D. Hötzel

2. Berichterstatter: Professor Dr. H. Linser

Tag der mündlichen Prüfung: 24. 7. 1970



Gedruckt mit Unterstützung des Deutschen
Akademischen Austauschdienstes.

	<u>Seite</u>
1. Einleitung und Fragestellung	6
2. Literaturübersicht	8
3. In vitro-Untersuchungen und Ergebnisse	18
3.1 Bestimmung der Pyruvatdehydrogenase-Aktivität	18
3.2 Einfluß verschiedener Sulfidverbindungen auf die Aktivität der Pyruvatdehydrogenase	18
3.2.1 Natriumpyrosulfid und Pyruvatdehydrogenase	18
3.2.1.1. Steigende Konzentrationen von Pyruvat und sulfidgehemmte Pyruvatdehydrogenase	19
3.2.1.2. Steigende Konzentrationen von TPP und sulfidgehemmte Pyruvatdehydrogenase	21
3.2.1.3. Dialyse und sulfidgehemmte Pyruvatdehydrogenase	23
3.2.2 Acetaldehyd- und Glucosenatriumhydrogensulfid und Pyruvatdehydrogenase	24
3.3 Hemmung der Pyruvatdehydrogenase durch Sulfid bei der oxidativen Decarboxylierung von Pyruvat	29
3.4 Einfluß von 2,5-Dimethyl-4-aminopyrimidinsulfonsäure auf die Pyruvatdehydrogenase	30
3.5 Einfluß von 2,5-Dimethyl-4-aminopyrimidinsulfonsäure auf die Thiaminpyrophosphokinase	32
4. In vivo-Untersuchungen und Ergebnisse	35
4.1 Einfluß von 2,5-Dimethyl-4-aminopyrimidinsulfonsäure auf die Pyruvatdehydrogenaseaktivität bei vollernährten Ratten	35

4.2	Einfluß höherer Konzentrationen von 2,5-Dimethyl-4-aminopyrimidinsulfonsäure und Sulfit auf die Pyruvatdehydrogenaseaktivität bei vollernährten Ratten	37
4.3	Effekt einer chronischen Sulfitverabreichung auf Pyruvatdehydrogenase und Lipoamid-dehydrogenase bei Thiaminmangelratten	40
4.4	Einfluß einer niedrigen akuten Sulfitgabe auf die Aktivitäten von Pyruvatdehydrogenase, Lipoamiddehydrogenase, Transketolase und Malat-Dehydrogenase bei mit Thiamin-vollernährten Ratten	43
4.5	Einfluß einer höheren akuten Sulfitgabe auf die Aktivitäten von Lipoamiddehydrogenase und Pyruvatdehydrogenase in Abhängigkeit von der Zeit bei mit Thiamin-voll- und mangelernährten Ratten	46
5.	Diskussion	51
6.	Zusammenfassung	56
6.1	In vitro-Experimente	56
6.2	In vivo-Experimente	57
<u>Anhang: Methoden</u>		
7.	Anreicherung von Enzymen	58
7.1	Darstellung der Pyruvatdehydrogenase aus Schweineherzen	58
7.1.1	Methode nach KORKES et al., (1952); DAWSON et al. (1960) und HOLZER et al. (1961)	58
7.1.2	Methode nach SANADI, LITTLEFIELD und BOCK (1952) und HAYAKAWA et al. (1966)	59
7.2	Herstellung von Pyruvat-Decarboxylase (PDC) aus Bierhefe	60
7.2.1	Herstellung von Apopyruvatdecarboxylase (Apo-PDC)	61

	<u>Seite</u>
7.3 Herstellung der Arylaminacetyltransferase aus Taubenlebern	62
7.4 Herstellung von Thiaminpyrophosphokinase aus Rattenlebern	62
8. Bestimmung der Enzymaktivitäten	64
8.1 Bestimmung der Pyruvatdehydrogenase : Acetoin-Methode	64
8.2 Bestimmung der Pyruvatdehydrogenase : Optische-Methode	69
8.3 Bestimmung der Thiaminpyrophosphokinase	71
8.4 Bestimmung der Transketolase	74
8.5 Bestimmung der Lipoamiddehydrogenase	76
8.6 Bestimmung der Malatdehydrogenase	77
9. Tiermaterial und Tierhaltung	78
9.1 Organgewinnung und Homogenatherstellung	78
9.2 Zusammensetzung der Versuchskost	78
10. Enzymnomenklatur und Kennziffern	80
11. Literaturverzeichnis	81

1. Einleitung und Fragestellung

Die Toxizität von Sulfid ist nach Untersuchungen von Hötzel (1961 u. 1962) bei wachsenden Ratten weitgehend vom Versorgungszustand der Tiere mit Thiamin abhängig. Ratten, die ausreichend mit Thiamin versorgt wurden, konnten mehr als die zehnfachen Dosen an Sulfid tolerieren als Ratten im Thiaminmangelzustand (bei Versorgung mit 50 % des Minimalbedarfs). Dieser Befund ist auch für den Menschen von Bedeutung. Denn einerseits soll selbst in Deutschland bei einem größeren Bevölkerungskreis die Zufuhr von Thiamin deutlich unterhalb der empfohlenen Aufnahme liegen, wie aus dem im Auftrag des Bundesministers für Gesundheitswesen sowie des Bundesministers für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten erstellten Ernährungsbericht der DGE (1969) zu entnehmen ist. Andererseits kann es bei bestimmten Personen, insbesondere bei häufigem Weingenuß, aber auch in Industriegebieten mit hohem SO_2 -Gehalt der Luft, zu erheblichen Sulfidaufnahmen kommen. Über die Ursache der beobachteten Erhöhung der Sulfidtoxizität bei Thiaminmangel kann bis heute noch keine definitive Aussage gemacht werden. Einige Untersuchungsergebnisse sprechen dafür, daß es im Organismus zu einer Zerstörung des Thiamins durch Sulfid kommen kann, selbst wenn Sulfid vom Thiamin getrennt verabreicht wird. Es muß daher auch mit dem Auftreten der Thiaminspaltprodukte, 4-Methyl-5-hydroxyäthylthiazol und 2,5-Dimethyl-4-aminopyrimidinsulfonsäure gerechnet werden, von denen die Sulfonsäure normalerweise im Organismus nicht auftritt und über deren physiologische Wirkung noch wenig bekannt ist. Andererseits sprechen eine Reihe von Befunden und Überlegungen dafür, daß nicht allein eine Zerstörung des Thiamins durch Sulfid Ursache für die erhöhte Sulfidtoxizität im Thiaminmangel sein kann, sondern daß noch andere Faktoren eine wesentliche Rolle spielen müssen. Denkbar wäre, daß Sulfid, welches als sehrreaktionsfähige Ver-

bindung mit verschiedenen Metaboliten und Enzymen des Intermediärstoffwechsels reagieren kann, solche Metaboliten und Enzyme, die durch Thiaminmangel bereits eine Abnahme erfahren haben, weiter in Aktivität oder Konzentration vermindert.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es festzustellen,

1. ob die Enzyme Pyruvatdehydrogenase und Transketolase, die durch eine mangelhafte Versorgung des Organismus mit Thiamin eine Aktivitätsverminderung erfahren, durch Sulfid zusätzlich beeinflussbar sind;
2. ob NAD- und FAD-abhängige Enzyme, die durch Sulfid gehemmt werden, bei Thiaminmangel ebenfalls vermindert vorliegen.

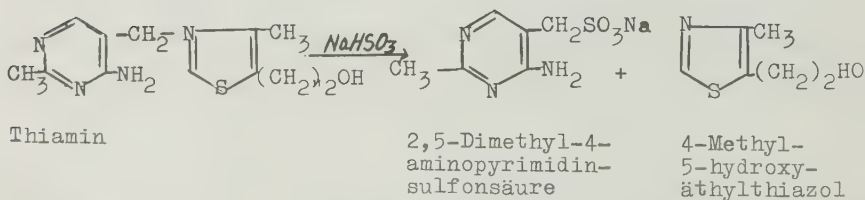
Besonders eingehend wurde die Beeinflussung der Pyruvatdehydrogenase durch Sulfid und Thiaminmangel untersucht, in einigen Versuchen wurde Transketolase, Malatdehydrogenase und Lipoamiddehydrogenase in die Untersuchungen mit einbezogen.

Eine andere Hypothese zur Erklärung der erhöhten Sulfidtoxizität bei Thiaminmangel geht davon aus, daß aus Thiamin und Sulfid ein Antithiamin entstehen könnte, welches bei bereits bestehendem Thiaminmangel zu einer weiteren Verschärfung des Mangelzustandes führen könnte. Als Reaktionsprodukt aus Thiamin und Sulfid ist die 2,5-Dimethylaminopyrimidinsulfonsäure bekannt. Ihr Einfluß auf die Pyruvatdehydrogenase und Thiaminpyrophosphokinase wurde dementsprechend getestet.

2. Literaturübersicht

Schweflige Säure und ihre Salze werden als technischer Hilfsstoff und als Konservierungsmittel in der Lebensmittelverarbeitung in vielen Ländern angewandt. Die gesetzlichen Vorschriften für die Anwendung in der Lebensmittelverarbeitung werden in den einzelnen Ländern unterschiedlich gehandhabt. Beispielsweise ist in der Bundesrepublik Deutschland Sulfrit als Zusatzstoff nur für einige Lebensmittel erlaubt.¹⁾ Beispielsweise ist im Liter Wein 300 ppm Gesamtsulfrit als Höchstgrenze zulässig, wovon 50 ppm als freies Sulfrit vorliegen dürfen. In anderen Ländern wird Sulfrit nicht nur zur Konservierung von Wein, sondern auch von Fleisch und Gemüse angewandt. Die bei Wein zugelassenen Mengen variieren zwischen 20 bis 100 ppm freiem und 130 bis 2000 ppm gebundenem Sulfrit (HEYDENREICH 1967). Diese Unterschiede in der nationalen Lebensmittelgesetzgebung wirken sich auf den zwischenstaatlichen Warenaustausch hemmend aus. Eine Angleichung wird im EWG-Bereich angestrebt.

Vom ernährungsphysiologischen Standpunkt aus ist die Umsetzung zwischen Sulfrit und Thiamin von besonderer Bedeutung, da das Thiamin hierbei zu vitaminunwirksamen Spaltprodukten abgebaut wird. Die Reaktion verläuft bei pH 5 schon bei Zimmertemperatur praktisch quantitativ nach folgender Gleichung (WILLIAMS, 1935; MORGAN, 1935 u. BUCHMAN, 1935):



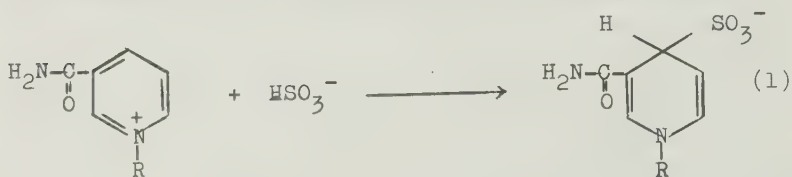
1) Die rechtlichen Grundlagen für die Anwendung von Sulfrit finden sich im Weingesetz (1969), in der Schwefeldioxydverordnung (1969) und in der Fruchtbehandlungsordnung (1959, in der Fassung von 1969).

Bei der Behandlung von Fruchtsäften, Wein, Trockenfrüchten (MORGAN, 1931, MORGAN et al, 1939) und Hackfleisch (HERMUS et al 1969) mit Sulfit konnte eine beträchtliche Verminderung des Thiamingehalts beobachtet werden. Die Zerstörung von Thiamin durch Sulfit scheint auch im Organismus stattzufinden. So fand HÖTZEL (1961, 1962) in Lebern von Ratten eine signifikante Verminderung des freien Thiamins bei chronischer, vom Futter getrennter Applikation von 40 oder 80 mg Sulfit/kg Ratte/Tag. LHUISSIER (1966), sowie LHUISSIER et al (1967) beobachteten, daß bei einer Gabe von 120 mg Kaliummetasulfit/kg Ratte/Tag im Trinkwasser die Thiaminausscheidung im Urin erniedrigt wurde. Der Autor führt die Ergebnisse auf eine Zerstörung des Thiamins im Magen-Darmtrakt zurück.

Bei Untersuchung der chronischen Toxizität von Sulfit an wachsenden Ratten ergab sich eine deutliche Abhängigkeit der Toxizität vom Versorgungszustand der Tiere mit Thiamin: Während bei einer Thiaminzufuhr von 50 % des Bedarfs schon bei Gaben von 40 mg Sulfit/kg Ratte/Tag 8 von 13 Versuchstieren starben, überlebten bei höherer Thiaminzufuhr die Versuchstiere auch noch Sulfitgaben von 400 mg/kg Ratte/Tag (HÖTZEL, 1961). Sulfit wurde in den Versuchen getrennt von der Kost appliziert, um Thiaminzerstörung im Futter auszuschließen. Eine Zerstörung von Thiamin könnte somit nur in vivo erfolgt sein. Dies scheint allerdings nicht allein der Grund für die erhöhte Toxizität von Sulfit bei Thiaminmangel zu sein, denn auch bei einmaliger parenteraler Verabreichung von Sulfit konnte ein deutlicher Toxizitätsunterschied in Abhängigkeit von der Thiaminversorgung beobachtet werden: Die LD_{50} betrug bei vollernährten Ratten 370 mg Sulfit/kg Körpergewicht, bei Thiaminmangel dagegen 425 mg Sulfit/kg Körpergewicht (HÖTZEL 1961, 1962). Es ergab sich weiterhin, daß die Toxizität des Sulfits nicht wesentlich von seiner Bindungsform abhängig ist: Eine

Verabreichung in Form von Natriumdisulfit oder eine Verabreichung als Glucose- bzw. Acetaldehydhydroxysulfonat ergab etwa die gleiche Toxizität (HÖTZEL, MUSKAT, CREMER 1965). Untersuchungen von WILMES (1966) zeigten in Übereinstimmung mit den Befunden von HÖTZEL (1961, 1962), daß die Toxizität von Sulfit von der Thiaminversorgung abhängig ist. WILMES fand weiterhin, daß eine über den Bedarf hinausgehende Thiaminzufuhr die Toxizität von Sulfit verminderte, daß aber bei einer Steigerung der Thiamingabe über das fünf-fache des normalen Bedarfs die toxische Grenzdosis von Sulfit nicht weiter erhöht werden konnte.

Sulfit reagiert sehr leicht mit Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD). OHLMEYER u. MÖHLE (1938) beobachteten spektroskopisch bei der Einwirkung von Sulfit auf NAD eine NAD-Sulfitverbindung, für deren Zusammensetzung KUHN eine "Acetyldehyd-bisulfit-Verbindung" vorgeschlagen hatte:

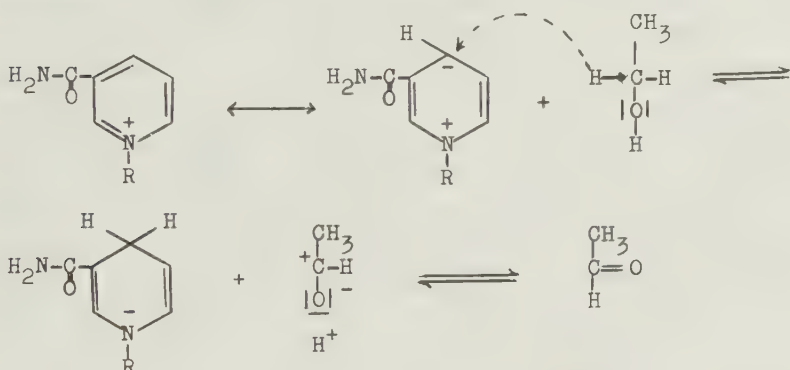


Die biologische Bedeutung dieser Reaktion ergibt sich aus der Tatsache, daß durch solche Adduktbildung aus NAD und Sulfit viele Enzyme, die NAD für ihre Aktivität benötigen, durch Sulfit gehemmt werden können.

PFLÉIDERER u. Mitarb. (1956) war es gelungen, die Aktivitäten einiger isolierter Dehydrogenasen aus verschiedenen tierischen Organen durch variierende Mengen von Sulfit zu hemmen: Lactat-dehydrogenase aus Schweine-Herzmuskel wurde mit 2 mcg Sulfit bis zu 25 % gehemmt; Äpfelsäure-dehydrogenase wurde durch 2-10 mcg Sulfit ebenfalls bis zu 25 % gehemmt. Glutaminsäure-dehydrogenase und Glycerophosphat-

dehydrogenase waren viel weniger gegen Sulfit empfindlich.

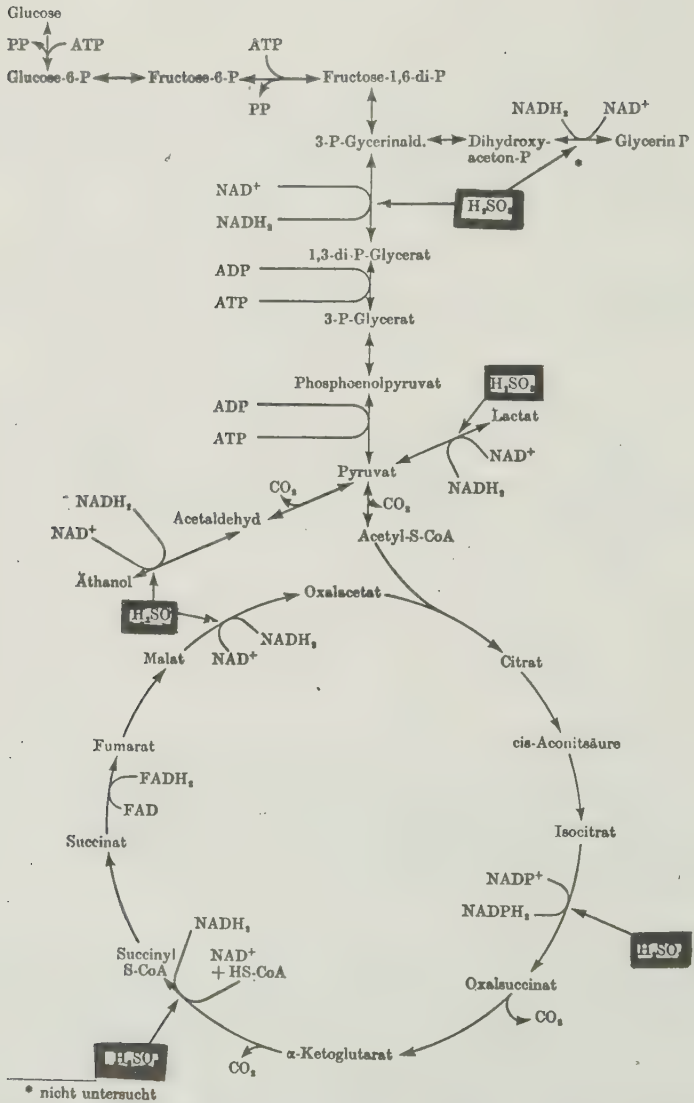
Bei der Hemmung dieser Enzyme lagert Sulfit sich an die Haftstelle des natürlichen Substrats und blockiert dadurch die Dehydrierung des Substrats (PFLEIDERER, JECKEL u. WIELAND, 1957) (Vgl. Gleichung 1 und 2).



(2)

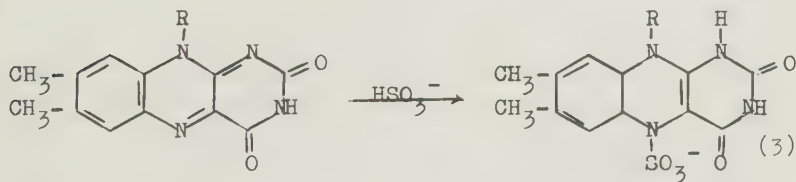
Die Hemmwirkung von Sulfit auf Lactat-dehydrogenase, Glutamat- und Glycerophosphat-dehydrogenase wurde weiterhin von CIACCIO (1966) und EYS (1958) untersucht. Ihre Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit denjenigen von PFLEIDERER et al. (1956).

Außerdem haben WALLNÖFER und Mitarbeiter (1965) und REHM und Mitarbeiter (1965) gezeigt, daß Sulfit-additionsverbindungen mit Ketosäuren, Acetaldehyd, Natriumpyruvat, Aceton, Benzaldehyd und Glucose eine deutliche Atmungshemmung bei Saccharomyces cerevisiae Karlsberg verursachen. Die Hemmung beruht ebenfalls auf einer Blockierung des Nicotinamid-adenin-dinucleotid. In Schema 2 sind die untersuchten Reaktionen, die durch Sulfit gehemmt werden, zusammengestellt.

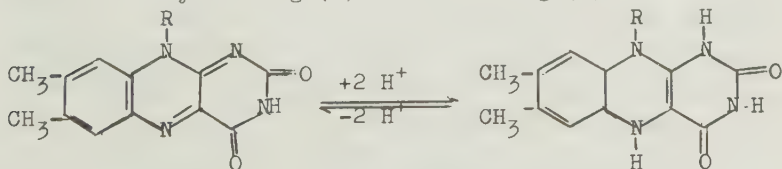


Schema 2: Hauptangriffspunkte des Sulfits, insbesondere auf NAD-abhängige Reaktionen in der Glykolyse und im Citratzyklus (WALLNÖFER u. REHM).

Auch zwischen Sulfit und FAD kann eine Reaktion erfolgen: Bei den Untersuchungen, die sich mit dem Verhalten der Glukose-oxidase aus Aspergillus niger gegenüber Bisulfit befaßten, beobachteten BENNETT u. MASSEY (1966), daß eine Reaktion zwischen Sulfit und dem Enzym Veränderungen in den natürlichen Absorptionsspektren der Glukose-oxidase verursachte. Glucose-oxidase-gebundenes Flavin-adenin-dinucleotid: (FAD) (gelbe Farbe) wurde unter dem Einfluß von Sulfit entfärbt. Das entfärbte FAD hatte ein Absorptionsspektrum, ähnlich dem des reduzierten FAD (FADH₂). Aufgrund dieser Beobachtung und weiteren spektroskopischen Untersuchungen des entfärbten Enzyms vermuteten BENNETT u. MASSEY, daß die Hemmwirkung des Sulfits auf die Glucose-oxidase auf eine Komplex-Bindung zwischen der FAD-Gruppe des Enzyms und dem Sulfit zurückzuführen sei. Für diesen Komplex wurde von ihnen die folgende Gleichung aufgestellt:



Durch die Reaktion 3 wird die Anionenhaftstelle des Flavin-adenin-dinucleotids blockiert und dadurch seine katalysatorische Reaktion verhindert (vgl. die Gleichung für die natürliche Hydrierung (4) mit Gleichung (3)).



Nach DODSON, SPENGER u. WILLIAMS (1955) hemmt Sulfit die Aktivität von Arylsulphatase schon ab 0,025 M Natriumbisulfitkonzentration bis zu 17 %. Die Hemmechanismen des Sulfits sind bei diesem Enzym nicht bekannt.

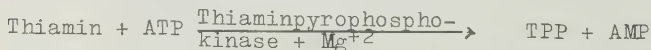
Sulfit hemmt weiterhin kompetitiv die enzymatische Umwandlung von Thiosulfat in Hydrogensulfit (H_2S) bei Extrakten aus Hefe und E. Coli (AIRA^u McELROY, 1959).

Natriumsulfit vermindert in Konzentrationen von 0,5 bis 0,05 M auch die Aktivität des Lysozyms bis auf 66 % (0,5 M) bzw. 23 % (0,05 M) der Aktivität der Kontrollen. Dieser Effekt wird durch Anwesenheit von Sauerstoff, Silberionen und Harnstoff verstärkt. Durch Erhöhung des pH-Wertes auf 9 konnte der Aktivitätsverlust verhindert werden (AZARI, 1966).

Es wird verschiedentlich berichtet, daß durch die Behandlung von Apfelsaft (REDDI et al., 1950), Tomatensaft (CHMIELMICKA, 1964) und von anderen pflanzlichen Produkten (MONIKOWSK, CASIMIR, EDVIGE u. CHMIELMICKA, 1964) mit Sulfit die Aktivität der Peroxydase herabgesetzt wird und dadurch erhöht Sulfit die Stabilität der Ascorbinsäure. Sulfit dient demnach als Stabilisator für Vitamin C.

Thiamin entfaltet seine biologische Wirkung in Form des Diphosphorsäureesters dem Thiaminpyrophosphat (TPP), auch Cocarboxylase genannt.

Thiaminpyrophosphat wird in den Zellen, insbesondere in der Leber, enzymatisch aus Thiamin und Adenosintriphosphat (ATP) unter Katalysierung durch Thiaminpyrophosphokinase synthetisiert (LEUTHARD u. NIELSON, 1952).



Thiaminpyrophosphat spielt im Kohlenhydratstoffwechsel eine wichtige Rolle. Die wichtigsten Reaktionen TPP-abhängiger Enzyme am Beispiel der Pyruvat-Decarboxylierung sind:

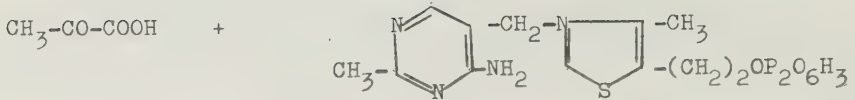
1. Die einfache Decarboxylierung durch Carboxylase in Hefen
 $\text{Pyruvat} \longrightarrow \text{Acetaldehyd} + \text{CO}_2$
2. Die Acetoinbildung bei Mikroorganismen und in kleinem Umfang bei höheren Tieren.
 $2 \text{ Pyruvat} \longrightarrow \text{Acetoin} + \text{CO}_2$
 $\text{Pyruvat} + \text{Acetaldehyd} \longrightarrow \text{Acetoin} + \text{CO}_2$
3. Die phosphoklastische Decarboxylierung bei Mikroorganismen.
 $\text{Pyruvat} + \text{Phosphat} \longrightarrow \text{Acetylphosphat} + \text{Formiat}$
4. Die oxydative Decarboxylierung bei Tieren
 $\text{Pyruvat} \longrightarrow \text{Acetyl-CoA} + \text{CO}_2 + \text{H} + 2 \text{ e}$

Entsprechende Reaktionen bei α -Ketoglutar säure führen durch oxydative Decarboxylierung zu Succinyl-CoA.

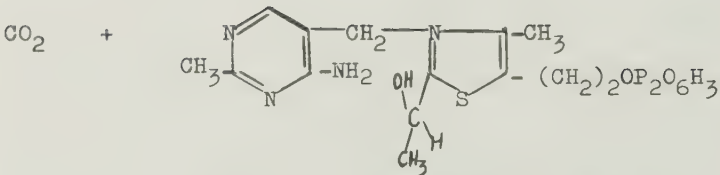
Im tierischen Organismus ist die Reaktion (4) die wichtigste, welche durch Pyruvatdehydrogenase katalysiert wird, ein Enzym, welches im Organismus allgemein verbreitet ist.

Unter Pyruvatdehydrogenase versteht man einen Multienzymkomplex aus drei einzelnen Enzymen: Pyruvatdecarboxylase (KLINE u. BARKER, 1950), Liponsäurereduktase-transacetylase (CLIO u. BABB, 1948), und Lipoamiddehydrogenase (REED, BUSK, JOHNSON u. GETZENDANE, 1951). Die Reaktion (4) läßt sich in drei einzelne Teilreaktionen zerlegen:

1. Die erste Reaktion wird von Thiaminpyrophosphat unter Beteiligung der Pyruvatdecarboxylase wie folgt katalysiert.

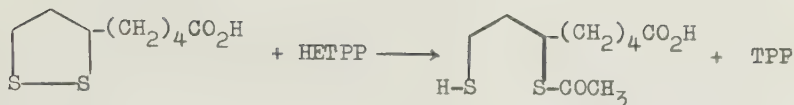


Thiaminpyrophosphat (TPP)

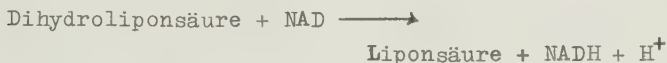


2 (α-Hydroxyäthyl-) Thiaminpyrophosphat (HETPP)
= "aktiver Acetaldehyd"

2. Der "aktive Acetaldehyd", das primäre Decarboxylierungsprodukt des Pyruvats, wird durch die Katalysierung von Liponsäure-reduktase-transacetylase und in Anwesenheit von Coenzym A in Acetyl-Coenzym A umgewandelt:



3. Die reduzierte Liponsäure wird durch NAD unter Katalysierung, durch Dihydrolipoamid-dehydrogenase in die oxydierte Form zurückgeführt nach der Gleichung:



Die Reaktionen 1, 2 und 3 sind voneinander abhängig, ihre Bedeutung liegt vor allem darin, daß sie zur Synthese des Acetyl-Coenzym A, einem wichtigen Ausgangsprodukt im Citronensäurezyklus führen. So fanden WARBURG, GEISLER und LORENZ (1970a, 1970b), daß Vitamin B-Mangel oder auch Vitamin B₁-Mangel (Thiaminmangel) allein den Umschlag des embryonalen Stoffwechsels in den Krebsstoffwechsel erzeugen kann, weil auf dem Atmungsweg die Oxydation von Brenztraubensäure durch Thiamin zu Essigsäure blockiert wird. Thiamin ist nach diesen Autoren imstande, die Anfangsstadien des bereits umgeschlagenen Stoffwechsels wieder in den normalen Stoffwechsel zurückzuverwandeln. Thiamin scheint also sowohl für den normalen Stoffwechsel des Organismus als auch für die Verhütung des Krebses notwendig zu sein.

Eine Zerstörung oder das Fehlen irgendeiner dieser Coenzyme oder auch Hemmung der Pyruvatdehydrogenase selbst, führt zu einer Behinderung des gesamten Kohlenhydratstoffwechsels auf der Stufe des Pyruvats.

5. In vitro-Untersuchungen und Ergebnisse

3.1. Bestimmung der Pyruvatdehydrogenase-Aktivität

Die Pyruvatdehydrogenase wurde durch Katalysieren der Pyruvatdecarboxylierung bestimmt, wobei als Nebenprodukt Acetoin entsteht, welches quantitativ bestimmt wurde. Dies entspricht im Prinzip dem Vorgehen von SCRIBA u. HOLZER (1961), GREEN et al. (1942) und JUNI et al. (1951). Die Methode wurde durch Veränderung der Volumina modifiziert und die Enzymreaktion durch Proteinfällung mit Zinkhydroxid nach SOMOGYI (1930) gestoppt. Wenn nicht besonders erwähnt, wurde bei der Enzymbestimmung die Proteinmenge so gewählt, daß im 3 ml Ansatz mindestens 5 mcg Acetoin in 30 Minuten synthetisiert wurden. Die Aktivität der Pyruvatdehydrogenase wurde in mcg Diacetyl/mg Protein/Stunde angegeben, da die Eichkurve mit Diacetyl und nicht mit Acetoin aufgestellt worden war.

Die bei den in vitro-Versuchen verwendeten Pyruvatdehydrogenase-Präparate wurden nach der Methode von KORKES et al. (1952), DAWSON et al. (1957), HOLZER et al. (1961), sowie HAYAKAWA et al. (1966) gereinigt.

3.2. Einfluß verschiedener Sulfitverbindungen auf die Aktivität der Pyruvatdehydrogenase

3.2.1. Natriumpyrosulfit und Pyruvatdehydrogenase

Bei der Bestimmung der Pyruvatdehydrogenase-Aktivität in Anwesenheit verschiedener Mengen von Sulfit in Form einer Natriumpyrosulfit-Lösung pH 7,0 ergab sich, wie in Tabelle 1 ersichtlich ist, daß Pyruvatdehydrogenase durch Sulfit gehemmt wird.

Tabelle 1: Pyruvatdehydrogenase-Aktivität in An- und Abwesenheit verschiedener Mengen von Sulfit.

(Pyruvatdehydrogenase-Aktivität : mcg Diacetyl/
mg Protein/Std.)

Sulfit M	Pyruvat M	Pyruvatdehydrogenase-Aktivität	Hemmung in %
0	10.9×10^{-4}	4,8	0
1.7×10^{-4}	10.9×10^{-4}	4,8	0
3.4×10^{-4}	10.9×10^{-4}	3,8	20,8
5.1×10^{-4}	10.9×10^{-4}	3,3	31,3
6.8×10^{-4}	10.9×10^{-4}	2,4	50,0
8.3×10^{-4}	10.9×10^{-4}	1,7	64,6

Um eine ca. 50 %ige Hemmung zu erhalten, war eine 6.8×10^{-4} M Sulfit-Konzentration im Ansatz erforderlich. Das entspricht etwas mehr als der Hälfte der Pyruvatkonzentration.

Theoretisch denkbar wäre, daß der beobachtete Hemmeffekt durch eine Störung der Acetoinbestimmungsmethode hervorgerufen wird, denn Sulfit kann sehr leicht mit Ketoverbindungen wie Acetoin und Diacetyl reagieren. Aus diesem Grund wurde überprüft, ob Sulfit in den angewandten Konzentrationen in der Lage ist, die Reaktion von Diacetyl mit Kreatin und α -Naphthol zu beeinflussen (s. Tab. 2).

Die Ergebnisse zeigen, daß Sulfit in den Konzentrationen, bei denen eine deutliche Hemmung des Enzyms erfolgt, keinen Einfluß auf die Bestimmungsmethode hat: (Die Sulfitkonzentrationen in Tab. 1 u. 2 sind identisch; die unterschiedlichen Zahlenwerte sind darauf zurückzuführen, daß die Enzymreaktion im 3 ml Ansatz durchgeführt wurde und dieser Ansatz nach Abstoppen der Reaktion auf 7 ml verdünnt wird zur Acetoinbestimmung).

Tabelle 2: Einfluß von Sulfit auf die Bestimmung von Diacetyl

mcg Diacetyl/ 7 ml Probe	Sulfit M	E _{546 nm}
10	0	0.152
10	14.2×10^{-5}	0.151
10	14.2×10^{-5}	0.149
10	21.3×10^{-5}	0.151
10	28.4×10^{-5}	0.151
10	35.5×10^{-5}	0.149

3.2.1.1. Steigende Konzentrationen von Pyruvat und sulfitgehemmte Pyruvatdehydrogenase

In folgendem Versuch sollte überprüft werden, auf welche Art und Weise die Pyruvatdehydrogenase durch Sulfit gehemmt wird. Sulfit kann mit Carbonylverbindungen Hydroxy-Sulfonate bilden. Die Verbindung zwischen Sulfit und Pyruvat ist nach Untersuchungen von REHM, WALLNÖFER und KESKIN (1965) bei pH 6, dem pH-Wert der Enzymbestimmung, beständig. Denkbar wäre, daß als Folge davon eine Pyruvatverminderung eintreten könnte, wodurch die Pyruvatdehydrogenase blockiert werden würde, weil nicht ausreichend Pyruvat für eine maximale Reaktion zur Verfügung steht.

Es wurde daher die Aktivität der Pyruvatdehydrogenase bei steigender Pyruvat- aber konstanter Sulfitkonzentration bestimmt (s. Tab. 3).

Die Ergebnisse zeigen, daß der beobachtete Hemmeffekt des Sulfits auf die Aktivität der Pyruvatdehydrogenase nicht auf einer Substrat-(Pyruvat)-minderung beruhen kann, da

der Hemmeffekt durch steigende Pyruvatmengen nicht rückgängig gemacht werden konnte.

Tabelle 3: Pyruvatdehydrogenase-Aktivität in Anwesenheit konstanter Sulfitkonzentration ($6.8 \times 10^{-4}M$) und variierender Pyruvatkonzentration.
(Pyruvatdehydrogenase-Aktivität = mcg Diacetyl/
mg Protein/Stunde)

	Sulfit M	Pyruvat M	Pyruvat- dehydrogenase- Aktivität	Hemmung in %
1	0	10.9×10^{-4}	5,2	0
2	$6,8 \times 10^{-4}$	10.9×10^{-4}	2,2	57,8
3	"	13.1×10^{-4}	2,2	57,8
4	"	15.3×10^{-4}	2,0	61,8
5	"	16.4×10^{-4}	2,3	55,8
6	"	19.6×10^{-4}	2,3	55,8
7	"	21.8×10^{-4}	2,3	55,8
8	"	32.7×10^{-4}	2,3	55,8
9	"	49.6×10^{-4}	2,4	53,8
10	"	54.5×10^{-4}	2,1	59,6
11	"	65.4×10^{-4}	2,1	59,6
12	"	76.3×10^{-4}	2,1	59,6
13	"	87.2×10^{-4}	2,1	59,6

3.2.1.2. Steigende Konzentrationen von TPP und sulfitgehemmte Pyruvatdehydrogenase

Es ist vorstellbar, daß die Hemmung der Pyruvatdehydrogenaseaktivität durch Sulfit darauf beruht, daß Thiaminpyrophosphat, der Cofactor des Enzyms, durch Sulfit zerstört wird, entsprechend der von WILLIAMS et al. (1935) beschriebenen Umsetzung zwischen Thiamin und Sulfit.

Die Pyruvatdehydrogenase wurde deshalb bei gleichbleibender Sulfitkonzentration (6.8×10^{-4} M) und verschiedenen Thiaminpyrophosphat-Konzentrationen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigt folgende Tabelle:

Tabelle 4: Pyruvatdehydrogenase-Aktivität in Anwesenheit konstanter Sulfitkonzentration (6.8×10^{-4} M) und variierender Thiaminpyrophosphat-Konzentration. (Pyruvatdehydrogenase-Aktivität = mcg Diacetyl/mg Protein/Stunde)

	Thiaminpyrophosphat M	Pyruvatdehydrogenase-Aktivität	Hemmung in %
1	6.7×10^{-4}	5,1	0
2	6.7×10^{-4}	3,4	29,4
3	10.0×10^{-4}	3,6	29,4
4	13.4×10^{-4}	3,6	29,4
5	16.8×10^{-4}	3,6	29,4
6	20.1×10^{-4}	3,5	31,4
7	26.8×10^{-4}	3,6	29,4

Es konnte hierbei nur eine ca. 32,4 %ige Hemmung des Enzyms durch eine Sulfitkonzentration von $6,7 \times 10^{-4}$ M unter optimalen Bedingungen beobachtet werden (vgl. Tab. 1 und 4). Die im Vergleich zu Tab. 1 geringere Hemmung ist wahrscheinlich auf unterschiedliche Versuchsbedingungen zurückzuführen.

Die Ergebnisse in Tab. 4 zeigen, daß durch steigende Konzentrationen von Thiaminpyrophosphat die Hemmung der Pyruvatdehydrogenase durch Sulfit nur um ca. 2,8 % aufgehoben werden konnte. Somit kann die Hemmung nicht auf einer Zerstörung des Thiaminpyrophosphats durch Sulfit beruhen.

3.2.1.3. Dialyse und sulfitgehemmte Pyruvatdehydrogenase

Theoretisch denkbar wäre, daß eine direkte Reaktion zwischen Sulfit und dem Enzymprotein selbst stattfindet, wodurch es zu einer Verringerung der Konzentration an wirksamer Pyruvatdehydrogenase kommen könnte. Vorausgesetzt, daß die Pyruvatdehydrogenase durch Sulfit nicht vollständig denaturiert wird, müßte die Hemmwirkung durch Dialysieren aufgehoben werden können, wenn eine irreversible Sulfit-Enzymprotein-Bindung nicht auftritt. Um das zu überprüfen, wurde der folgende Versuch durchgeführt:

Ein Pyruvatdehydrogenasepräparat wurde mit Sulfit in Kaliumphosphatpuffer, pH 6,0, 30 min bei 37° inkubiert. Die Konzentration des Sulfits wurde so gewählt, daß sich in der zu prüfenden Enzymlösung eine Endkonzentration von 6.8×10^{-4} M Sulfit ergab. Ein aliquoter Teil der Enzymlösung wurde auf Acetoinbildung untersucht, der Rest wurde gegen 0,02 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0, zwei Stunden dialysiert und ein aliquoter Teil davon ebenfalls auf Acetoinbildung untersucht.

Tabelle 6: Einfluß einer Dialyse auf die sulfitgehemmte Pyruvatdehydrogenaseaktivität. (Pyruvatdehydrogenase = mcg Diacetyl/mg Protein/Stunde.)

	Dialysiert		Undialysiert	
	mit Sulfit	ohne Sulfit	mit Sulfit	ohne Sulfit
mcg Diacetyl	7.7	7.7	3.8	7.5
pro mg				
Protein				
pro Stunde				

Die in Tabelle 6 zusammengestellten Ergebnisse zeigen, daß durch Dialysieren der Enzymlösung gegen Kaliumphosphat-

puffer die Hemmung der Pyruvatdehydrogenase durch Sulfit vollständig aufgehoben wurde, d. h. Sulfit hat nicht irreversibel mit dem Enzymprotein reagiert.

3.2.2. Acetaldehyd- und Glucosenatriumhydrogensulfit und Pyruvatdehydrogenase

Aufgrund der Ergebnisse von HÖTZEL, MUSKAT u. CREMER (1965), daß die Sulfit-Additionsverbindungen von Acetaldehyd- und Glucose¹⁾ bei Ratten etwa gleich toxisch wirken wie Sulfit, erschien es wünschenswert, den Einfluß dieser Verbindungen auf die Pyruvatdehydrogenase zu überprüfen. Tabelle 7 u. 8 und Abb. 1 u. 2 zeigen die Ergebnisse.

Tabelle 7: Beeinflussung der Pyruvatdehydrogenase-Aktivität durch Glucosenatriumhydrogensulfit. (Pyruvatdehydrogenase-Aktivität = mcg Diacetyl/mg Protein/Stunde).

Glucosenatrium- hydrogensulfit M	Pyruvat M	Pyruvatdehydro- genase-Aktivi- tät	Hemmung in %
0	10.9×10^{-4}	5.6	0
2.1×10^{-5}	10.9×10^{-4}	2.9	48.2
4.1×10^{-5}	10.9×10^{-4}	2.3	59.0
6.1×10^{-5}	10.9×10^{-4}	1.8	67.9
8.2×10^{-5}	10.9×10^{-4}	1.5	73.2
10.3×10^{-5}	10.9×10^{-4}	1.4	75.0
12.4×10^{-5}	10.9×10^{-4}	1.2	78.6
14.5×10^{-5}	10.9×10^{-4}	1.1	80.3

1) Die beiden Additionsverbindungen des Sulfits wurden von HÖTZEL, MUSKAT u. CREMER (1965) nach den Vorschriften von KERP (1908) präparativ aus analysenreinem Kaliumhydrogensulfit und SO_2 unter Verwendung von absolutem Alkohol als Entwässerungsmittel dargestellt.

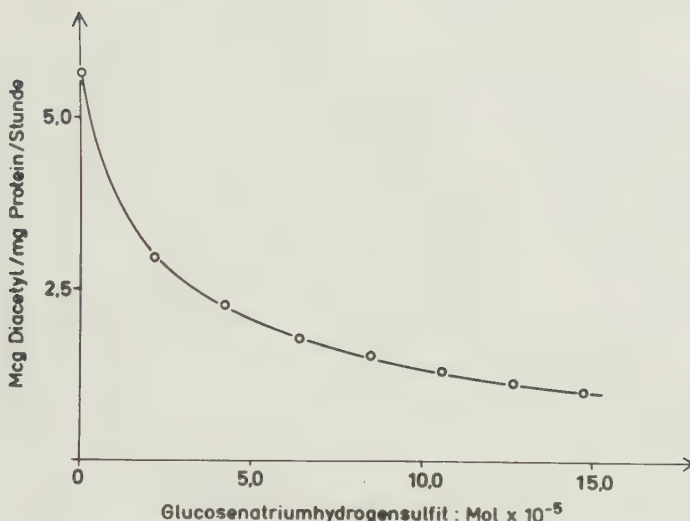


Abb. 1: Pyruvatdehydrogenaseaktivität in Anwesenheit verschiedener Mengen von Glucosenatriumhydrogensulfit

Bei Glucosenatriumhydrogensulfit zeigte sich ein besonders deutlicher Abfall der Pyruvatdehydrogenaseaktivität im Anfangsbereich der gewählten Konzentration bis zu 14.5×10^{-5} M. Der Tabelle 7 ist ferner zu entnehmen, daß Glucosenatriumhydrogensulfit wesentlich stärker hemmend wirkt als Natriumpyrosulfit, so daß eine Hemmung von etwa 50 % bereits mit einer 2.1×10^{-5} M Konzentration an Glucosenatriumhydrogensulfit erreicht wurde (vgl. Tabellen 1 und 7).

Bei der Untersuchung des Einflusses von Acetyldehydriumsulfit auf die Pyruvatdehydrogenase ergab sich dagegen, daß Acetaldehydnatriumhydrogensulfit die Pyruvatdehydrogenaseaktivität nicht hemmte, sondern sie im Gegenteil aktivierte (Tab. 8 und Abb. 2).

Tabelle 8: Beeinflussung der Pyruvatdehydrogenaseaktivität durch Acetaldehydnatriumhydrogensulfit.

(Pyruvatdehydrogenase-Aktivität = mcg Diacetyl / mg Protein / Stunde)

Acetaldehydnatriumhydrogensulfit	Pyruvat	Pyruvatdehydrogenaseaktivität	Aktivierung in %
M	M		
0	10.9×10^{-4}	5,0	0
4.7×10^{-4}	10.9×10^{-4}	11.9	124,0
9.4×10^{-4}	10.9×10^{-4}	13.6	170,0
14.1×10^{-4}	10.9×10^{-4}	15.6	210,0
16.5×10^{-4}	10.9×10^{-4}	16.1	222,0
18.8×10^{-4}	10.9×10^{-4}	16.9	238,0
23.2×10^{-4}	10.9×10^{-4}	17.0	240,0

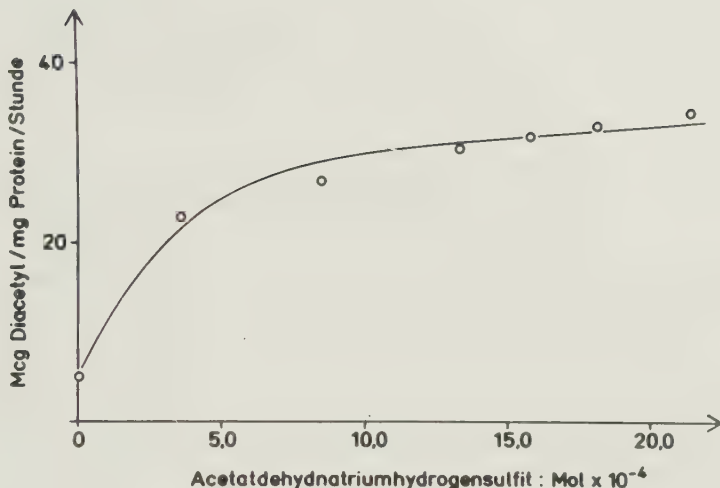


Abb. 2: Pyruvatdehydrogenaseaktivität in Anwesenheit variierender Konzentrationen von Acetaldehydnatriumhydrogensulfit.

Als Ursache für die Aktivierung wird angenommen, daß Acetaldehydnatriumhydrogensulfit entweder als solches oder aber nach teilweiser Dissoziation zu Acetaldehyd die Acetoinbildung beschleunigt hat. Die Acetoinbildung durch Pyruvatdehydrogenase läßt sich nach Angaben verschiedener Autoren (GREEN et al. 1942, JUNI u. HYEM 1955, HOLZER et al. 1961, SINGER und PENSKY 1952) in Gegenwart von Acetaldehyd als Acceptor intensiv steigern.

In einem weiteren Versuch wurde daher die Pyruvatdehydrogenasereaktion in Gegenwart von 2.3×10^{-3} M Acetaldehyd durchgeführt. Es sollte überprüft werden, ob 2.3×10^{-3} M

Acetaldehyd die gleiche Aktivierungswirkung auf die Pyruvatdehydrogenase wie 2.3×10^{-3} M Acetaldehyd-Natriumhydrogensulfit haben. Zweitens sollte ermittelt werden, bei welcher Sulfitkonzentration die Pyruvatdehydrogenase in Gegenwart von Acetaldehyd gehemmt wird. In Tabelle 9 sind die erhaltenen Ergebnisse zusammengestellt.

Tabelle 9: Einfluß von 2.3×10^{-3} M Acetaldehyd und Sulfit auf die Pyruvatdehydrogenase.
(Pyruvatkonzentration = 10.9×10^{-4} M)

	Sulfit M	Pyruvatdehydrogenase mcg Diacetyl/mg Prot. / Stunde	Hemmung in %
1 (kein Acetaldehyd)	0	5,0	0
2 "	0	65,4	0
3 "	5.1×10^{-3}	57,8	11,6
4 "	10.4×10^{-3}	47,7	27,1
5 "	15.5×10^{-3}	37,9	42,0
6 "	20.7×10^{-3}	27,2	58,7
7 "	25.9×10^{-3}	14,9	77,3

Es ergab sich, daß die Geschwindigkeit der Pyruvatdehydrogenase-Reaktion durch eine Acetaldehydkonzentration von 2.3×10^{-3} M deutlich gesteigert wurde; und zwar war die Pyruvatdehydrogenase-Aktivität zwölfmal höher in Gegenwart von Acetaldehyd und ca. dreimal höher als die Pyruvatdehydrogenase-Aktivität in Anwesenheit gleicher Konzentrationen von Acetaldehyd-Natrium-Hydrogensulfit. Aufgrund dieser Ergebnisse kann angenommen werden, daß Acetaldehyd-Natriumhydrogensulfit einerseits ähnlich wie Acetaldehyd die Acetoinbildung durch Pyruvatdehydrogenase zu steigern

vermag, daß aber gleichzeitig ein Hemmeffekt des Sulfid auf das Enzym erfolgt.

Im Vergleich zu den Ergebnissen in Tabelle 1 wurden in diesem Fall viel höhere Konzentrationen von Sulfid für eine merkliche Hemmung der Pyruvatdehydrogenase benötigt.

3.3 Hemmung der Pyruvatdehydrogenase durch Sulfid bei der oxidativen Decarboxylierung von Pyruvat

Im folgenden Versuch sollte überprüft werden, ob Sulfid bei der oxidativen (aeroben) Decarboxylierung des Pyruvats zu Acetyl-CoA in gleichem Umfang wie bei der Acetoinbildung (anaerobe Umsetzung des Pyruvats) hemmend wirkt, denn die oxidative Decarboxylierung stellt den Hauptweg des Pyruvatabbaus im tierischen Organismus dar (KORKES et al., 1952). Wie aus Tabelle 10 ersichtlich ist, wirkt Sulfid ebenfalls hemmend auf die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat, nur sind hierbei etwa 10mal höhere Konzentrationen nötig als bei der Acetoin synthese.

Tabelle 10: Einfluß von Sulfid auf die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat.

(Pyruvatdehydrogenase-Aktivität = $\Delta E/\text{min.}/\text{mg Protein}$)

Sulfid M	Pyruvatdehydrogenase-Aktivität	Hemmung in %
0	0,034	
5 x 10 ⁻⁴	0,048	
10 x 10 ⁻⁴	0,044	keine
15 x 10 ⁻⁴	0,038	Hemmung
20 x 10 ⁻⁴	0,036	
25 x 10 ⁻⁴	0,034	

Fortsetzung Tabelle 10:

Sulfit M	Pyruvatdehydrogenase-Aktivität	Hemmung in %
0	0,031	0
4.0 x 10 ⁻³	0,028	9,7
8.0 x 10 ⁻³	0,027	12,9
12.0 x 10 ⁻³	0,025	19,4
16.0 x 10 ⁻³	0,023	25,8
20.0 x 10 ⁻³	0,022	29,0
24.0 x 10 ⁻³	0,020	35,5
28.0 x 10 ⁻³	0,017	45,2

Die niedrigen Konzentrationen, die bei der Acetoinsynthese eine mehr als 50 % Hemmung hervorriefen, bewirkten bei der oxidativen Decarboxylierung sogar eine Aktivierung (s. Tab. 12). Erst bei einer ca. 10-fach höheren Konzentration wirkte Sulfit auch hemmend auf die oxidative Decarboxylierung.

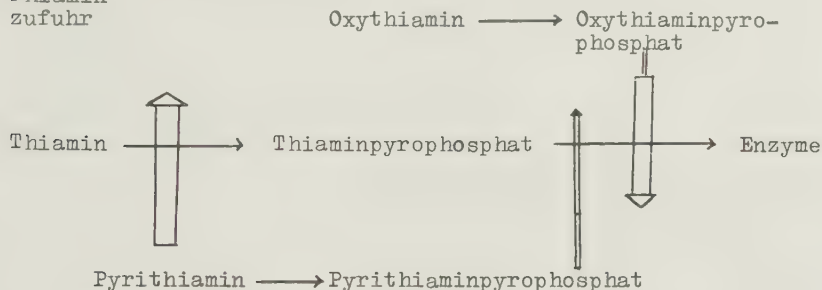
3.4 Einfluß von 2.5-Dimethyl-4-aminopyrimidinsulfonsäure auf die Pyruvatdehydrogenase

BAGHAT und LOCKETT hatten 1964 beobachtet, daß bei der Einwirkung von Sulfit auf getrocknete Hefe eine oder mehrere Verbindungen entstanden, die bei der Ratte Antithiaminwirksamkeit zeigten. Uns interessierte, ob möglicherweise die 2,5-Dimethyl-4-aminopyrimidinsulfonsäure, die bei der Einwirkung von Sulfit auf Thiamin entsteht, für die beschriebene Antithiaminwirksamkeit verantwortlich ist.

Nach STEYN-PARVE (1967) gibt es verschiedene Mechanismen, nach denen Antithiamine ihre Wirksamkeit entfalten (s. Schema 2): Während Pyriethiamin ein wirksamer Inhibitor der

Thiaminpyrophosphokinase ist, hemmt Oxythiamin dieses Enzym nur geringfügig, dagegen sehr intensiv alle Enzyme, die durch Thiaminpyrophosphat aktiviert werden.

Thiamin-
zufuhr



Schema 2: Interferenz im Thiaminstoffwechsel durch metabolism Pyritthiamin and Oxythiamin (STEYN-PARVE, 1967)

Bisherige Mitteilungen haben gezeigt, daß durch die Reaktion zwischen Thiamin und Sulfit in vitro nur 4-Methyl-5-Hydroxyäthyl-thiazol und 2.5-Dimethyl-4-aminopyrimidinsulfonsäure entstehen können (WILLIAMS et al., 1935; LHOESI et al. 1957). Da es sich bei 4-Methyl-5-hydroxyäthyl-thiazol um eine normalerweise im Organismus beim Thiaminabbau auftretende Verbindung handelt, prüfte ich nur den Einfluß von 2,5-Dimethyl-4-aminopyrimidinsulfonsäure auf die Aktivität der Pyruvatdehydrogenase. Die Pyruvatdehydrogenase-Reaktion wurde in An- und Abwesenheit verschiedener Konzentrationen von 2,5-Dimethyl-4-aminopyrimidinsulfonsäure durchgeführt.

Wie aus Tabelle 5 hervorgeht, hat die 2,5-Dimethyl-4-aminopyrimidinsulfonsäure in den angewandten Konzentrationen keinen Einfluß auf die Pyruvatdehydrogenase.

Tabelle 5: Pyruvatdehydrogenase-Aktivität in An- und Abwesenheit verschiedener Mengen von 2,5-Dimethyl-4-aminopyrimidinsulfonsäure.
(Pyruvatdehydrogenase-Aktivität = mcg Diacetyl/
mg Protein/Stunde).

	Pyrimidinsulfonsäure M	Pyruvatdehydrogenase-Aktivität
1	0	5,1
2	9,8	5,4
3	1,5	5,4
4	2,0	5,2
5	2,9	5,1
6	3,9	5,3

3.5 Einfluß von 2,5-Dimethyl-4-amino-pyrimidinsulfonsäure auf die Thiaminpyrophosphokinase

Nach den Ergebnissen von 3.4 hatte die 2,5-Dimethyl-4-aminopyrimidinsulfonsäure keinen Einfluß auf die durch TPP aktivierbare Pyruvatdehydrogenase. Es war daher naheliegend, zu untersuchen, wie sie sich gegenüber Thiaminpyrophosphokinase verhält.

Die Thiaminpyrophosphokinase wurde aus Acetontrockenpulver von Rattenlebern isoliert (s. Methodik S.63). Es wurden zunächst die enzymkinetischen Eigenschaften des Enzyms untersucht (s. Methodik S.72). Dabei stellte sich heraus, daß die Substratsättigung für Thiamin bei einer 12.0×10^{-7} M Konzentration gewährleistet ist. Die Bestimmung von TPP erfolgt nach der Methode von HOLZER et al.(1956).

Bei der Untersuchung, welchen Einfluß 2,5-Dimethyl-4-aminopyrimidinsulfonsäure auf die Thiaminpyrophosphokinase ausübt, wurden Enzymbestimmungen in Gegenwart konstanter Mengen der Sulfonsäure und variierender Mengen an Thiamin durchgeführt (s. Tab. 13). Die angewandte Konzentration an Sulfonsäure (3.8×10^{-3} M) hatte sich in Vorversuchen als günstig erwiesen.

Tabelle 13: Wirkung der 2,5-Dimethyl-4-aminopyrimidinsulfonsäure auf Thiaminphosphokinase in Gegenwart steigender Thiaminkonzentrationen

	Thiamin M	TPP synthetisiert in nMol/mg Protein/Std. ohne mit Sulfonsäure		Hemmung in %
1	3.3×10^{-7}	126,0	112,5	10,6
2	5.0×10^{-7}	126,0	104,4	18,1
3	6.4×10^{-7}	133,7	93,4	30,4
4	8.3×10^{-7}	128,4	102,8	20,0
5	10.0×10^{-7}	126,0	43,4	26,0
6	11.6×10^{-7}	106,0	83,6	21,1

Inkubationszeit = 1 Stunde; Temperatur: 37°C

Bestimmung des entstandenen TPP erfolgte durch einen gekoppelten optischen Test nach HOLZER et al. (1956)
(s. Methodik S. 69)

Die Ergebnisse zeigen, daß 2,5-Dimethyl-4-aminopyrimidinsulfonsäure ein Hemmstoff der Thiaminphosphokinase ist. Im Vergleich mit anderen Thiaminphosphokinase-Hemmstoffen wie Pyrithiamin und Oxythiamin, ist die 2,5-Dimethyl-4-aminopyrimidinsulfonsäure jedoch sehr viel schwächer:

Pyrithiamin hemmt 50 % der Thiaminpyrophosphokinase-Aktivität in einer Konzentration von etwa 1.3×10^{-7} M; Oxythiamin hemmt 50 % des gleichen Enzyms in einer Konzentration von etwa $1,5 \times 10^{-4}$ M (GUBLER u. JOHNSON, 1967). Dagegen beobachteten wir bei einer Konzentration von $3,8 \times 10^{-3}$ M nur eine 10 bis 30 %ige Hemmung der Thiaminpyrophosphokinase-Aktivität durch 2,5-Dimethyl-4-aminopyrimidinsulfonsäure. Eine derart hohe Konzentration an 2,5-Dimethyl-4-aminopyrimidinsulfonsäure kann sicherlich im Organismus nicht auftreten, selbst wenn es in vivo zu einer Umsetzung zwischen Thiamin und Sulfit kommt.

4. In vivo-Untersuchungen und Ergebnisse

4.1 Einfluß von 2,5-Dimethyl-4-aminopyrimidinsulfonsäure auf die Pyruvatdehydrogenaseaktivität bei vollernährten Ratten

In der folgenden Untersuchung sollte geprüft werden, wie sich 2,5-Dimethyl-4-aminopyrimidinsulfonsäure in vivo gegenüber Pyruvatdehydrogenase verhält. Als Versuchstiere dienten 40 männliche Wistarratten mit einem durchschnittlichen Anfangsgewicht von 90-100 g. Die Tiere wurden in zwei Gruppen AI und AII eingeteilt. Die Tiere beider Gruppen erhielten eine halbsynthetische Kost, die den Bedarf der Ratten an essentiellen Nährstoffen voll deckte. Die Zusammensetzung ist auf S. 78 und 79 angegeben. Die Tiere der Gruppe AI erhielten 1 mg 2,5-Dimethyl-4-aminopyrimidinsulfonsäure-Natrium in 0,5 ml Wasser intraperitoneal verabreicht. Die Tiere der Gruppe AII erhielten als Kontrollen 0,5 ml einer 0,9 %igen Kochsalzlösung, ebenfalls intraperitoneal. Nach 43 Tagen Versuchsdauer wurden alle Tiere getötet. In den Homogenaten der Herzen (Herstellung s. Methodik) musste die Aktivität der Pyruvatdehydrogenase bestimmt werden. In Tabelle 14 ist die Gewichtsentwicklung der Ratten zusammengestellt.

Tabelle 14: Gewichtsentwicklung von Ratten

Versuchszeit	AII Kontrollen	AI mit Pyrimidinsulfonsäure
Bei Beginn	105,5 $\pm$ 4,8	106,6 $\pm$ 4,9
nach 18 Tagen	222,4 $\pm$ 20,9	240,8 $\pm$ 23,2
nach 43 Tagen	277,4 $\pm$ 20,5	298,2 $\pm$ 31,0

Die Gewichtsentwicklung war normal. Die durch Gabe von 2,5-Dimethyl-4-aminopyrimidinsulfonsäure bewirkte Wachstumsver-

besserung war nicht signifikant.

Die Aktivitätsbestimmung der Pyruvatdehydrogenase im Herzmuskelhomogenat wurde mit und ohne Vorinkubation mit Thiaminpyrophosphat (TPP) durchgeführt. Dieses Verfahren wurde gewählt, um das eventuell isolierte Fehlen des Coenzyms TPP bei unvermindertem Gehalt an Apopyruvatdehydrogenase zu erfassen. Das war notwendig, weil sich bei den in vitro-Versuchen herausgestellt hatte, daß 2,5-Dimethyl-4-aminopyrimidinsulfonsäure die Synthese von TPP hemmen kann (s.S.33). Die Aktivierung der Pyruvatdehydrogenase mit TPP erfolgte in diesem und in den weiteren Versuchen in einer Konzentration von 6.67×10^{-4} M. Die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmungen sind in Tabelle 15 aufgeführt.

Tabelle 15: Pyruvatdehydrogenase-Aktivität in Rattenherzen mit und ohne Belastung mit 2,5-Dimethyl-4-aminopyrimidinsulfonsäure.
(Pyruvatdehydrogenase-Aktivität = mcg Diacetyl/mg Protein/Stunde).

Tiergruppe	Teststoff	mcg Diacetyl/ mg Protein/Std.		TPP- Effekt %
		ohne TPP	mit TPP	
AI (n=10)	Sulfonsr.	7.1±2,1	10,9±2,9	54
AII(n=10)	-	6,6±1,8	9,9±2,0	50
	P >	25%	25%	

Bei diesem Versuch konnte kein signifikanter Einfluß von 2,5-Dimethyl-4-aminopyrimidinsulfonsäure auf die Aktivität der Pyruvatdehydrogenase festgestellt werden.

4.2 Einfluß höherer Konzentrationen von 2,5-Dimethyl-4-aminopyrimidinsulfonsäure und von Sulfit auf die Pyruvatdehydrogenaseaktivität bei vollernährten Ratten

Im vorhergehenden Versuch hatte sich gezeigt, daß eine Gabe von 1 mg 2,5-Dimethylpyrimidin-Sulfonsäure/Ratte/Tag die Gewichtszunahme der Versuchstiere günstig beeinflusste. Bei der Bestimmung der Pyruvatdehydrogenase waren nur geringfügige Unterschiede zwischen den Enzymaktivitäten der Versuchs- und der Kontrolltiere beobachtet worden. Im folgenden Versuch wurde eine höhere Konzentration von 2,5-Dimethyl-4-aminopyrimidinsulfonsäure gewählt. Gleichzeitig wurde der Einfluß von Sulfit auf die Pyruvatdehydrogenase untersucht.

Die Aktivitätsmessung der Pyruvatdehydrogenase wurde wie vorher mit und ohne TPP ausgeführt. Die erzielten Meßwerte sind in Tab. 16 angeführt.

Die Aktivität mit TPP war bei den mit Sulfit behandelten Ratten (AI) ca. 22 % niedriger als die der Kontrolltiere und der mit 2,5-Dimethyl-4-aminopyrimidinsulfonsäure behandelten Ratten; d. h. die Pyruvatdehydrogenase war bei den mit Sulfit behandelten Ratten deutlich gehemmt. Der Unterschied ist statistisch signifikant ($t = 2,66$; $P < 0,01$). Die Hemmung kann nicht durch Zerstörung oder Verdrängung des Thiaminpyrophosphats erklärt werden, da die Aktivität ohne TPP genauso groß war wie bei den Kontrolltieren.

Tabelle 16: Aktivität der Pyruvatdehydrogenase in Herzen voll-
ernährter Ratten mit und ohne i.p. Injektion von
2.5-Dimethyl-4-aminopyrimidinsulfonsäure oder Sulfit.

Pyruvatdehydrogenaseaktivität = mcg Diacetyl / mg
Protein / Stunde.

Angegeben ist der Mittelwert von je zehn Tieren und
die Standardabweichung

Tiergruppe	Teststoff	mg Test- stoff/kg Ratte/ Tag	mcg Diacetyl/mg Pro- tein/Stunde		TPP-Effekt %
			ohne TPP	mit TPP	
AI	Sulfit	200	8.4 $\pm$ 2.3	18.5 $\pm$ 2.4	120
AII	2.5-Dime- thyl-4- aminopyri- dinsul- fonsäure	10	12.1 $\pm$ 2.3	23.5 $\pm$ 2.8	94
AIII	--	--	8.9 $\pm$ 2.2	23.7 $\pm$ 1.9	166

Einen ganz anderen Effekt zeigte die 2,5-Dimethyl-4-aminopyrimidinsulfonsäure auf die Aktivität der Pyruvatdehydrogenase: Die Unterschiede zwischen den Aktivitäten mit TPP waren bei den Gruppen AII und AIII nicht ($t = 0,06$; $P > 0.25$), der Unterschied zwischen den Aktivitäten ohne TPP dagegen war signifikant ($t = 2.17$; $P < 0,025$).

Diese Differenz deutet auf eine Zunahme des TPP-Gehalts in den Herzen der Gruppe AII. Es ist denkbar, daß wesentliche Mengen der 2,5-Dimethyl-4-aminopyrimidinsulfonsäure in TPP umgewandelt wurden, eventuell durch die Darmflora.

Tabelle 17: Einfluß von 2,5-Dimethyl-4-aminopyrimidinsulfonsäure und Sulfit auf die Gewichtsentwicklung von vollernährten Ratten

Versuchszeit	Sulfit	Sulfonsäure	ohne Teststoff
	AI	AII	AIII
Bei Beginn	75,4 $\pm$ 10,5	78,3 $\pm$ 10,6	67,8 $\pm$ 5,0
nach 19 Tagen	179,5 $\pm$ 14,2	193,4 $\pm$ 17,5	166,7 $\pm$ 13,1
nach 49 Tagen	348,4 $\pm$ 58,8	381,0 $\pm$ 59,5	294,5 $\pm$ 36,8
nach 90 Tagen	443,8 $\pm$ 68,7	456,3 $\pm$ 70,7	374,0 $\pm$ 42,6

In Tabelle 17 ist die Gewichtszunahme der Tiere zusammengestellt. Die in früheren Befunden beim Wachstum gefundene günstige Wirkung von 2,5-Dimethyl-4-aminopyrimidinsulfonsäure wurde in diesem Versuch bestätigt. Ebenfalls konnte eine größere Gewichtszunahme bei den mit Sulfit behandelten Ratten beobachtet werden.

4.3 Effekt einer chronischen Sulfit-Verabreichung auf Pyruvatdehydrogenase und Lipoamid-dehydrogenase bei Thiaminmangelratten

Die Pyruvatdehydrogenaseaktivität im Thiaminmangelzustand ist bereits mit verschiedenen Methoden bestimmt worden. Bis auf wenige Autoren (KOEDAM, 1958; MONFOORDT, 1955) beobachteten die meisten Forscher keine Korrelation zwischen der Schwere des Thiaminmangelzustandes und der Pyruvatoxydaseaktivität (WRIGHT et al., 1954; JONES et al., 1960; GUBLER, 1961; GUBLER et al., 1962; DREYFUS et al., 1961; ROBERTS et al., 1963; KOEPPE et al., 1959, 1964; BENNETT, 1964). Die Autoren sind übereinstimmend der Meinung, daß die Apopyruvatdehydrogenase auch im Thiaminmangelzustand unvermindert vorhanden, und daß daher eine Reaktivierung mit Thiaminpyrophosphat möglich ist. In eigenen vorhergehenden Versuchen war gezeigt worden, daß Sulfit bei vollernährten Ratten in vivo hemmend auf die Pyruvatdehydrogenase wirkte. Die gehemmte Pyruvatdehydrogenase konnte durch Inkubation mit TPP nicht vollständig reaktiviert werden. Es war deshalb von Interesse zu ermitteln, inwieweit Sulfit die schon durch Thiaminmangel reduzierte Pyruvatdehydrogenase beeinflussen kann. Lipoamid-dehydrogenase, die zu dem Maltienzymkomplex der Pyruvatdehydrogenase gehört und deren Aktivität bei der Umsetzung des Pyruvats im tierischen Organismus benötigt wird, wurde aufgrund ihres Gehalts an Flavin-adenin-dinucleotid (FAD) bestimmt. Es ist nämlich bekannt, daß Sulfit mit FAD zu reagieren vermag (BENNETT et al. 1966). Die Bestimmung der Lipoamid-dehydrogenase erfolgte nach HAYAKAWA et al. (1966).

Die vollversorgten Kontrolltiere erhielten Thiamin in einer Menge, die den Bedarf voll deckte, Thiaminmangelratten erhielten Thiamin in einer Menge, die nur 50 % des Bedarfs deckte, jedoch bei ausreichender Versorgung mit allen anderen Nährstoffen (s. Methodik). Der Versuch dauerte insge-

samt 28 Wochen. Die Tiere wurden dann getötet und die Herzhomogenate auf ihren Gehalt an Pyruvatdehydrogenase und Lipoamid-dehydrogenase untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 18 angegeben.

Tabelle 18: Einfluß von Sulfit auf Pyruvatdehydrogenase und Lipoamid-dehydrogenase.
(Pyruvatdehydrogenaseaktivität = mcg Diacetyl/
mg Protein / Stunde)
Lipoamid-dehydrogenase = Internationale Einheit

Versuchsgruppe	A	BI	BII
Thiamin in Prozent des Bedarfs	100	50	50
Sulfit	0	0	400 mg/kg Ratte/Tag
Anfangsgewicht	140,8	149,8	148,3
Endgewicht	377,9	287,2	201,0
Lipoamid-dehydroge- naseaktivität	26,7 ± 4,6	22,9 ± 5,4	28,0 ± 4,1
Pyruvatdehydrogenase- aktivität			
Aktivität mit TPP	27,9 ± 6,1	18,4 ± 4,3	17,2 ± 5,3
Aktivität ohne TPP	14,2 ± 5,2	4,5 ± 1,8	3,4 ± 1,8
TPP - Effekt %	96,5	332,0	406,0

Vergleicht man die Gewichtsentwicklung der drei Versuchstiergruppen, so zeigt sich eine Gewichtszunahme bei den mit Thiamin vollversorgten Tieren, praktisch ein Gewichtsstillstand bei den mit Thiamin unterversorgten Tieren, während eine chronische Applikation von Sulfit bei mit Thiamin unterversorgten Tieren zu einer Gewichtsabnahme führte.

Dies deutet auf eine Verschlechterung des Thiaminmangelzustandes der Tiere in Gruppe BII durch Sulfit hin.

Die Aktivität der Pyruvatdehydrogenase mit und ohne TPP zeigte erwartungsgemäß eine deutliche Abhängigkeit von der Thiaminversorgung: höhere Aktivitäten bei den mit Thiamin vollernährten als bei den mit Thiamin unterversorgten Tieren. Weiterhin zeigte sich, daß bei Thiaminunterversorgung nur ein Teil der Pyruvatdehydrogenase durch Inkubation mit TPP reaktiviert werden kann. Es muß also durch den Thiaminmangelzustand zu einer Abnahme des Apoenzyms gekommen sein. Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von REINAUER, GRASSOW und HOLLMANN (1968). Ein zusätzlicher Einfluß von Sulfit auf die verminderten Enzymaktivitäten bei Thiaminunterversorgung war nur bei Bestimmung der Aktivität ohne TPP feststellbar, während die Aktivität mit TPP durch Sulfit praktisch nicht beeinflusst wurde. Diese Tatsache könnte so gedeutet werden, daß ein Teil des TPP durch Sulfit zerstört worden ist.

Die Aktivität der Lipoamiddehydrogenase zeigte eine geringfügige Abnahme bei mangelhafter Thiaminversorgung und eine deutliche Aktivitätssteigerung unter dem Einfluß von Sulfit bei Thiaminmangelratten. Die Unterschiede zwischen den Gruppen mit und ohne Sulfit waren signifikant ($P > 2,5 \%$). Eine Erklärung für diese Aktivitätssteigerung kann nicht gegeben werden.

4.4. Einfluß einer niedrigen akuten Sulfitgabe auf die Aktivitäten von Pyruvatdehydrogenase, Lipoamiddehydrogenase, Transketolase und Malat-Dehydrogenase bei Thiamin-vollernährten-Ratten

Aufgrund der Ergebnisse von Versuch 2, daß Sulfit in vivo einen Einfluß auf die Aktivitäten von Pyruvatdehydrogenase und Lipoamiddehydrogenase ausübt, sollte im folgenden Versuch geprüft werden, wie schnell die Wechselwirkung zwischen den genannten Enzymen und Sulfit erfolgen kann. Zusätzlich wurden in diesem Versuch die Aktivitäten von Transketolase und Malatdehydrogenase bestimmt.

Transketolase benötigt ebenfalls wie Pyruvatdehydrogenase Thiamin in Form von Thiaminpyrophosphat als Coenzym (RACKER, DE LA HABA und LEDER, 1953). Bei einer ungenügenden Versorgung eines Organismus mit Thiamin tritt schon sehr frühzeitig eine Abnahme der Transketolaseaktivität ein, bedingt durch die Abnahme des TPP-Gehalts in den Geweben (BRIN, 1964; BRIN et al., 1965). Durch die Bestimmung der Transketolaseaktivität erhält man einen guten Einblick in den Thiaminversorgungszustand eines Organismus, und falls Thiamin durch Sulfit in vivo zerstört wird, müßte dieses durch eine Verminderung der Transketolaseaktivität nachzuweisen sein. Die Transketolasereaktion wurde nach der Methode von SCHOUTEN et al. (1964) im hämolysierten Rattenblut anhand der Sedoheptuloseproduktion mit und ohne Zusatz von Thiaminpyrophosphat durchgeführt. Dieses Meßverfahren war wie bei der Pyruvatdehydrogenaseaktivitäts-Bestimmung erforderlich, um das Fehlen des Coenzym (TPP) bei eventuell unverminderter Apotransketolase zu erfassen.

Die Bestimmung der Malatdehydrogenase erfolgte, um eine weitere Dehydrogenase in die Untersuchungen einzubeziehen.

Von Malatdehydrogenase ist bekannt, daß sie von Sulfit in vitro stark gehemmt wird (PFLEIDERER, JECKEL und WIELAND, 1956) und daß sie sich im Thiaminmangel bei der Ratte nicht verändert (DENS, BLUM und HOLZER, 1968). Die Bestimmung der Malatdehydrogenase erfolgte nach Boehringer-Information, Test MDH 0485.

Der Versuch wurde mit 20 vollernährten und 20 Thiaminmangelratten durchgeführt. Die vollernährten Tiere (Gruppe A) erhielten eine halbsynthetische Kost mit Thiamin in einer Menge, die 100 % des Bedarfs deckte (wie bei Versuch 1). Die Thiaminmangeltiere (Gruppe B) erhielten die gleiche Kost ohne Thiamin. Sobald die Tiere in Gruppe B an Gewicht verloren, d.h. 36 Tage nach Versuchsbeginn, wurde die Gruppe A in zwei Versuchsreihen AI und AII unterteilt. Gruppe AI und B bekamen als Kontrolltiere je 0,5 ml 0,9 %iger Kochsalzlösung. Die Tiere der Gruppe AII wurden mit 320 mg SO_2 /kg Körpergewicht belastet. Zwei Stunden nach der Applikation der Testlösungen wurden die Tiere getötet und in den Herzhomogenaten Pyruvatdehydrogenase, Lipoamiddehydrogenase und Malatdehydrogenase und im hämolysierten Blut die Transketolase bestimmt.

Da die Enzymaktivitäten in den Herzen der Thiaminmangelratten sehr niedrig waren, wurden je zwei Herzen zu einer Probe vereinigt.

Tabelle 19: Einfluß von Sulfit im Vergleich zu Thiaminmangel auf die Aktivitäten verschiedener Enzyme im Rattenblut und Rattenherzhomogenat¹⁾

a) Transketolaseaktivität

Tiergruppe	Teststoff	Thiamin- gabe in % des Bedarfs	uMol Sedoheptulose- 7Phosphat/min/1 Blut		TPP-Effekt
			mit TPP	ohne TPP	
AI	-	100	105 ± 3,2	92,0 ± 3,1	14,4
AII	SO ₂	100	96 ± 3,2	86,3 ± 3,8	11,4
B	-	0	22 ± 2,9	10,7 ± 2,2	106

b) Pyruvatdehydrogenaseaktivität

Tiergruppe	Teststoff	Thiamin- gabe in % des Bedarfs	mcg Diacetyl/mg Pro- tein/Stunde		TPP-Effekt
			mit TPP	ohne TPP	
AI	-	100	39,6 ± 3,2	19,0 ± 2,2	108
AII	SO ₂	100	33,5 ± 3,5	15,9 ± 2,1	123
B	-	0	29,0 ± 2,5	7,1 ± 1,3	313

c) Lipoamiddehydrogenase- und Malatdehydrogenaseaktivitäten

Tiergruppe	Teststoff	Thiamin- gabe in % des Bedarfs	Malatdehydrogenase Aktivität in Inter- nationaler Einheit	Lipoamidde- hydrogenase- aktivität in Internatio- naler Einheit
AI	-	100	1,3 ± 0,7	28,4 ± 3,9
AII	SO ₂	100	1,2 ± 0,5	28,1 ± 3,7
B	-	0	1,3 ± 0,6	28,9 ± 5,9

1) Gruppe AII erhielt 2 h vor dem Töten eine einmalige intra-peritoneale Injektion einer Sulfitlösung mit einem Gehalt von 350 mg SO₂.

In diesem Versuch ergab sich erwartungsgemäß eine deutliche Abnahme der Aktivitäten von Transketolase und Pyruvatdehydrogenase unter dem Einfluß des Thiaminmangels. Insbesondere die Transketolase-, aber auch die Pyruvatdehydrogenase-Aktivitäten konnten durch Vorinkubation mit TPP in vitro nicht völlig reaktiviert werden. Die beiden untersuchten Dehydrogenasen zeigten dagegen keinerlei Veränderung durch Thiaminmangel.

Die einmalige i.p. Gabe von Sulfit verminderte geringfügig und nicht signifikant die mit und ohne TPP bestimmten Aktivitäten von Transketolase und Pyruvatdehydrogenase. Die Tatsache, daß bei beiden Enzymen durch Vorinkubation mit TPP in vitro nicht die gleiche Enzymaktivität erreicht werden konnte wie bei den Kontrolltieren, deutet darauf hin, daß in diesem Fall keine Thiaminzerstörung durch Sulfit in vivo stattgefunden haben kann, sondern daß die Hemmung der Enzyme andere Ursachen haben muß.

Die beiden Dehydrogenasen zeigten keine Veränderung unter dem Einfluß von Sulfit.

4.5. Einfluß einer höheren akuten Sulfitgabe auf die Aktivitäten von Lipoamiddehydrogenase und Pyruvatdehydrogenase in Abhängigkeit von der Zeit bei mit Thiamin-voll- und mangelernährten Ratten

Im vorhergehenden Versuch war festgestellt worden, daß 320 mg SO_2 /kg Ratte in zwei Stunden einen schwachen, aber nicht signifikanten Einfluß auf Transketolase und Pyruvatdehydrogenase hatte und keinen Einfluß auf Lipoamiddehydrogenase und Malatdehydrogenase bei mit Thiamin vollversorgten Ratten. Darauf aufbauend sollte weiterhin untersucht werden:

1. ob höhere Konzentrationen von Sulfit einen Einfluß in verschiedenen Zeitabständen auf Lipoamiddehydrogenase und Pyruvatdehydrogenase haben,
2. zu welchem Zeitpunkt die Wechselwirkung zwischen Sulfit und den entsprechenden Enzymen stattfindet und
3. wie die aerobe Pyruvatdehydrogenasereaktion (die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat) durch Sulfit in verschiedenen Zeitabständen beeinflußt wird. In diesem Versuch wurde daher nicht wie in den vorhergehenden Versuchen die Acetoinmethode, sondern die optische Methode (s. S. 69) zur Bestimmung der Pyruvatdehydrogenase verwandt.

Die vergleichenden Untersuchungen über den Einfluß von Sulfit auf Enzyme wurden bei solchen Ratten durchgeführt, die entweder 100 % des Bedarfs oder kein Thiamin enthielten. Es wurden die Aktivitäten von Pyruvatdehydrogenase und Lipoamiddehydrogenase bestimmt.

80 männliche Ratten wurden in zwei Gruppen zu je 40 Ratten eingeteilt. Die Tiere einer Gruppe erhielten vollwertiges Futter mit Thiamin in einer Gabe, die 100 % des Bedarfs entspricht, die der zweiten Gruppe bekamen thiaminfreies Futter. Nachdem die Ratten der zweiten Gruppe an Gewicht verloren (siehe Tabelle 20), erhielten 30 Tiere pro Gruppe eine einmalige i.p. Injektion von 400 mg SO_2/kg Körpergewicht in Form einer $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ -Lösung. Die behandelten Ratten (10 pro Gruppe) wurden 30, 60 und 120 Minuten nach der Sulfitinjektion getötet und in den Herzhomogenaten wurden Pyruvatdehydrogenase und Lipoamiddehydrogenase bestimmt.

Die durchschnittliche Gewichtszunahme der Tiere ist in Tabelle 20 angegeben, die Ergebnisse der Enzymbestimmungen in den Tabellen 21 und 22.

Tabelle 20: Körpergewicht von gleichaltrigen, mit Thiamin vollversorgten aber mangelernährten Ratten

Thiamingehalt im Futter in % des Bedarfs	Anfangsgewicht	Endgewicht
100	106,7 $\pm$ 12,1	225,3 $\pm$ 15,6
0	106,0 $\pm$ 12,7	125,4 $\pm$ 16,6

Tabelle 21: Einfluß von Sulfit auf die Lipoamiddehydrogenaseaktivität in Rattenherzhomogenaten
Sulfitgabe = 400 mg SO_2 /kg Ratte
Enzymeinheit = Internationale Einheit

Thiamingehalt im Futter in % des Bedarfs	Zeit nach der Sulfitinjektion			
	Kontrolle	30 min	60 min	120 min
100	28,9 $\pm$ 7,1	29,5 $\pm$ 5,5	30,0 $\pm$ 4,2	23,6 $\pm$ 1,7
0	31,9 $\pm$ 6,4	30,4 $\pm$ 8,0	21,2 $\pm$ 4,0	25,8 $\pm$ 3,5

In diesem Versuch konnte ein deutlich hemmender Einfluß von Sulfit auf die Lipoamiddehydrogenase festgestellt werden, der zeitabhängig ist. Bei den Thiaminmangeltieren war die Lipoamiddehydrogenaseaktivität bereits 1 Stunde nach Sulfitinjektion signifikant niedriger als bei den Kontrolltieren, die kein Sulfit erhalten hatten ($p < 0,05$ %), bei den vollernährten Tieren dagegen erst nach 2 Stunden ($p < 1$ %). Diese Aktivitätsminderung scheint reversibel zu sein: die Thiaminmangeltiere zeigten schon zwei Stunden nach der Injektion eine höhere Enzymaktivität als 1 Stunde

nach der Injektion. Der Unterschied war signifikant ($p < 1 \%$), allerdings erreichte die Enzymaktivität noch nicht den Wert der Kontrolltiere.

Tabelle 22: Einfluß von Sulfit auf die Pyruvatdehydrogenaseaktivität in Rattenherzhomogenaten
Sulfitgabe = 400 mg SO_2 /kg Ratte
Pyruvatdehydrogenaseaktivität = ΔE / min / mg Protein

Thiamingehalt		Zeit nach der Sulfitinjektion			
im Futter in		Kontrolle	30 min	60 min	120 min
% des Bedarfs					
100	(a)	15,2 $\pm$ 3,4	18,2 $\pm$ 4,1	16,0 $\pm$ 2,6	12,4 $\pm$ 2,8
	(b)	14,1 $\pm$ 4,8	16,9 $\pm$ 2,1	15,6 $\pm$ 2,6	10,4 $\pm$ 2,7
	(c)	7,8	7,7	2,6	18,7
0	(a)	15,3 $\pm$ 5,1	18,8 $\pm$ 4,2	11,1 $\pm$ 2,0	11,0 $\pm$ 2,7
	(b)	5,5 $\pm$ 3,2	7,3 $\pm$ 0,9	3,6 $\pm$ 1,3	1,7 $\pm$ 2,8
	(c)	178	158	208	532

(a) = Pyruvatdehydrogenaseaktivität mit TPP

(b) = Pyruvatdehydrogenaseaktivität ohne TPP

(c) = TPP-Effekt in %

Auch die Pyruvatdehydrogenaseaktivität war in diesem Versuch durch Sulfit beeinflusst worden: Sowohl bei Thiaminmangelratten als auch bei vollernährten Ratten zeigte sich 30 min nach der Injektion ein leichter Aktivitätsanstieg, allerdings statistisch nicht sicherbar, und anschließend ein Abfall der Aktivität. Dieser Abfall war bei den Thiaminmangelratten bereits 1 Stunde nach der Injektion deutlich nachweisbar ($p < 1 \%$), bei den vollernährten Ratten erst 2 Stunden nach der Injektion, und zwar ge-

ringer und nicht statistisch sicherbar ($p > 5\%$).

Der TPP-Effekt erhöhte sich 2 Stunden nach der Injektion bei den vollernährten Ratten auf etwas mehr als das Doppelte, bei den Thiaminmangelratten auf das Dreifache. In beiden Fällen konnte das Enzym durch Inkubation mit TPP in vitro nicht wieder völlig reaktiviert werden. Beide Tatsachen lassen die Deutung zu, daß es durch Sulfid zu einer Zerstörung von Thiamin in vivo gekommen sein kann, daß aber sicherlich außerdem noch eine nach einem unbekannten Mechanismus erfolgte Hemmung des Enzyms erfolgt sein muß.

5. Diskussion

Die durchgeführten Untersuchungen können die Frage, warum die Toxizität von Sulfit bei Thiaminmangel erhöht ist, zwar nicht eindeutig beantworten; aber es ergeben sich eine Reihe von Ergebnissen, die zur Aufklärung des Mechanismus beitragen können. Das Enzym Pyruvatdehydrogenase, welches nach Untersuchungen von RENAUER, GRASSOW u. HOLJMAN (1968) bei Thiaminmangel eine Aktivitätsminderung erfährt, wird aufgrund meiner Ergebnisse durch Sulfit gehemmt, und zwar erfolgt die Hemmung bei der Decarboxylierung des Pyruvats und Reaktion des entstandenen "aktiven - Acetaldehyds" zu Acetoin. Eine Hemmung der Pyruvatdehydrogenase konnte sowohl in vitro bei Inkubation isolierter Enzympräparate mit Sulfit beobachtet werden, als auch in vivo nach chronischer oder akuter Applikation von Sulfit an Thiaminmangelratten oder vollernährte Ratten. Die Gabe von Sulfit an Ratten erfolgte dabei stets vom Futter getrennt, parenteral oder per Schlundsonde, so daß eine Zerstörung von Thiamin durch Sulfit im Futter oder im Magen-Darmtrakt ausgeschlossen werden konnte. Die Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß eine der Ursachen für die erhöhte Sulfittoxizität im Thiaminmangel auf einer Hemmung der bereits verminderte Pyruvatdehydrogenase beruhen kann.

Bei Thiaminmangeltieren wird der Pyruvatstoffwechsel durch sehr viel geringe Sulfitdosen in eine kritische Phase gebracht als bei vollernährten Tieren, da diese eine sehr viel höhere Aktivitätsreserve an Pyruvatdehydrogenase besitzen.

Die Untersuchungen zur Aufklärung des Hemmungsmechanismus ergaben, daß die Hemmung weder auf einer Reaktion von Sulfit mit dem Substrat (Pyruvat) noch mit dem Produkt (Acetoin) noch mit dem Cofaktor (Thiaminpyrophosphat) beruhen kann. Sulfit scheint vielmehr direkt mit dem Enzymprotein

zu reagieren. Da diese Hemmung sich als reversibel erwies, kann eine Reaktion zwischen Sulfit und Disulfidgruppen des Proteins ausgeschlossen werden. Nach WYSS (1948) reagiert Sulfit immer irreversibel mit Disulfidgruppen von Proteinen.

Der Mechanismus der Reaktion zwischen Sulfit und Pyruvatdehydrogenase scheint ähnlich zu sein wie bei der Reaktion zwischen Sulfit und Glucoseoxidase oder wie bei der Reaktion zwischen Sulfit und Lactatdehydrogenase. Beide Enzyme werden ebenfalls von Sulfit gehemmt und zwar führt die Reaktion zwischen Sulfit und FAD (Glucoseoxidase) bzw. zwischen Sulfit und NAD (Lactatdehydrogenase) zu einer Blockierung der elektronenübertragenden Funktion des Enzyms.

Pyruvatdehydrogenase ist ebenfalls ein FAD-Enzym. Eine Reaktion zwischen Pyruvatdehydrogenase und Sulfit via FAD wäre folglich möglich. Da die Bildung des Acetoins aus Pyruvat jedoch die elektronenübertragende Eigenschaft des Flavinadenindinucleotids nicht benötigt, kann kaum eine Aussage darüber gemacht werden, inwieweit eine Reaktion zwischen Sulfit und FAD für die hier beobachtete Hemmwirkung verantwortlich ist. Eine solche Reaktion könnte aber möglicherweise zu einer Konfigurationsänderung des Enzyms führen, wodurch die katalytische Funktion des Enzyms beeinträchtigt wird.

Zur weiteren Erklärung des Hemmeffektes auf Pyruvatdehydrogenase wurde ein Hemmversuch der NAD-FAD-abhängigen Schritte bei der Pyruvatdehydrogenase-Reaktion untersucht. Vorausgesetzt, daß die Aktivität der Pyruvatdehydrogenase durch eine Reaktion zwischen FAD und Sulfit blockiert wird, müßte die Reaktion von Pyruvat zu Acetyl-Coenzym A durch Sulfit gehemmt werden. Es zeigte sich allerdings nur bei sehr hohen Sulfitkonzentrationen eine Hemmwirkung. Wahrscheinlich ist die Diskrepanz dieser Ergebnisse dadurch bedingt, daß in dem sehr komplexen Ansatz, sehr viele Verbindungen

vorhanden waren, die mit Sulfit reagieren können, wodurch es sicherlich zu einer Minderung der stationären Sulfitkonzentration gekommen ist.

Einen weiteren Einblick in den Mechanismus der Hemmung von Pyruvatdehydrogenase durch Sulfit ergaben Parallelbestimmungen der Aktivitäten von Pyruvatdehydrogenase und Lipoamiddehydrogenase nach einmaliger Sulfitinjektion: Die Aktivität beider Enzyme war bei Thiaminmangelratten bereits 1 Stunde nach der Sulfitinjektion vermindert und zwar um ca. 27 % bzw. 33 %. Bei den normal ernährten Ratten waren dagegen die Aktivitäten derselben Enzyme erst 2 Stunden nach der Injektion vermindert und zwar beide um 18 %. Die Tatsache, daß die Aktivitäten beider Enzyme in etwa gleicher Größenordnung durch Sulfit vermindert wurde, könnte wie folgt erklärt werden: Die Lipoamiddehydrogenase gehört zu dem Multienzymkomplex der Pyruvatdehydrogenase, sie ist der mit FAD arbeitende Teil der Pyruvatdehydrogenase. Es ist möglich, daß eine Reaktion zwischen FAD und Sulfit stattfindet, wodurch die Lipoamiddehydrogenase gehemmt wird. Da die Pyruvatdehydrogenase-katalysierte Reaktion vom Pyruvat zu Acetyl-Coenzym A in ihrer Geschwindigkeit von den Aktivitäten beider Enzympartner abhängig ist, muß die Pyruvatdehydrogenase im gleichen Umfang wie die Lipoamiddehydrogenase gehemmt werden. Aufgrund dieses Befundes kann die Hypothese aufgestellt werden, daß für die Sulfit-Hemmwirkung der Pyruvatdehydrogenase möglicherweise als primären Angriffspunkt das FAD der Lipoamiddehydrogenase verantwortlich ist.

Die unterschiedliche Zeitabhängigkeit und Intensität der Enzymhemmung bei vollernährten und Thiaminmangelratten muß auf den unterschiedlichen Versorgungszustand der Tiere zurückgeführt werden: Vollernährte Ratten erwiesen sich als viel widerstandsfähiger als Thiaminmangelratten. Es könnte sein, daß die Entgiftungsgeschwindigkeit des Sulfits bei

Thiaminmangel vermindert ist. Aus der vorhandenen Literatur konnte zur Diskussion dieser Überlegung kein Hinweis gefunden werden. Bei Pflanzen ist aber bekannt, daß Thiamin die enzymatische Oxydation von Sulfit beschleunigt (TAGER u. RAUTANE, 1956).

Weiterhin wurde überprüft, inwieweit die nachgewiesene Hemmwirkung des Sulfits auch bei Carbonyl-Sulfit-Additionsverbindungen auftritt. Von großer Bedeutung sind Acetaldehyd- und Glucose-Natriumhydrogensulfit, welche bei der Schwefelung des Weines entstehen (TANNER, 1963; JURD, 1963 und KIELHÖFER, 1963). In entsprechenden Versuchen gelang es, mit Glucosenatriumhydrogensulfit eine Hemmung der Pyruvatdehydrogenase bei der Acetoinbildung nachzuweisen. Aus nicht geklärten Gründen wirkte GNHS stärker hemmend auf die Pyruvatdehydrogenase als Natriumpyrosulfit. Acetaldehyd-Natriumhydrogensulfit wirkte dagegen aktivierend. Dieses Phänomen läßt sich damit erklären, daß Acetaldehyd-Natriumhydrogen-Sulfit im wässrigen Milieu bei pH-Werten pH 6 dissoziiert in Acetaldehyd und Sulfit (JOSLYN u. BRAVERMAN, 1954; RHEIM, WALLNÖFER, u. KESKIN, 1965). Acetaldehyd ist aber nach zahlreichen Literaturangaben in der Lage, die Synthese von Acetoin aus Pyruvat erheblich zu verstärken (GREEN et al. 1942; JUNI u. HYEM, 1955; HOLZER et al., 1961; und SINGER u. PENSKY, 1952). Es besteht also die Möglichkeit, daß der hier beschriebene Aktivierungseffekt von Acetaldehyd-Natriumhydrogensulfit durch Acetaldehyd hervorgerufen wurde. Das Sulfit, das durch die Dissoziation von Acetaldehyd-Natriumhydrogensulfit freigesetzt wird, bewirkt wahrscheinlich eine Hemmung des Enzyms, die aber wegen der starken Aktivierung durch Acetaldehyd nicht signifikant in Erscheinung tritt.

Eine Hemmung von Enzymen durch Sulfit in vivo beobachtete meines Wissens bis jetzt nur BALABAEVA (1968). Er konnte bei Kaninchen, denen Sulfit intravenös injiziert wurde,

1 Stunde nach der Sulfitverabreichung eine Hemmung des Sauerstoffverbrauchs und der Decarboxylierung in den Erythrocyten feststellen.

Weiterhin war die Hypothese aufgestellt worden, daß aus Sulfit und Thiamin ein Antithiamin entstehen könnte, welches besonders bei Thiaminmangel zu einer Erhöhung des Mangelzustandes beiträgt. Für die untersuchte 2,5-Dimethyl-4-aminopyrimidinsulfonsäure kann eine Antithiaminwirksamkeit ausgeschlossen werden: Sie scheint also nicht dafür verantwortlich zu sein, daß die Sulfittoxizität im Thiaminmangel erhöht ist.

Abschließend läßt sich sagen, daß Sulfit in der Lage ist, durch Hemmung der Pyruvatdehydrogenase den Ablauf des Kohlenhydratstoffwechsels im Organismus zu stören. Da auch durch Thiaminmangel eine Verminderung der Pyruvatdehydrogenase auftritt, kommt es bei Kombination von Thiaminmangel und Sulfitgaben zu einer besonders intensiven Reduktion der Pyruvatdehydrogenase-Aktivität und damit zu einer verstärkten Störung beim Abbau der Kohlenhydrate. Die erhöhte Toxizität von Sulfit bei Thiaminmangel findet dadurch eine Teilerklärung.

6. Zusammenfassung

6.1 In vitro-Experimente

In Präparationen aus Schweineherzmuskel wurde der Einfluß von Sulfit auf die Aktivität der Pyruvatdehydrogenase - gemessen an der Acetoinbildung aus Pyruvat - untersucht. Es wurde festgestellt, daß die Acetoinbildung durch Sulfit bereits bei einer Konzentration von $3,4 \times 10^{-4}$ M deutlich gehemmt wurde und zwar nahm die Hemmung mit steigenden Sulfitkonzentrationen zu. Die Hemmung ließ sich weder durch Erhöhung der Pyruvat- noch durch Erhöhung der TPP-Menge beeinflussen, jedoch konnte durch Dialyse die volle Aktivität des Enzyms wiederhergestellt werden. Ähnlich wie Sulfit verhielt sich Glukosenatriumhydrogensulfit, während Acetaldehydnatriumhydrogensulfit ähnlich wie Acetaldehyd eine deutliche Steigerung der Acetoinbildung hervorrief.

In Präparationen aus Schweineherzmuskel wurde weiterhin der Einfluß von Sulfit auf die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat - gemessen an der Acetylcoenzym A-Bildung - untersucht. Auch hierbei konnte eine Hemmung durch Sulfit beobachtet werden, jedoch erst in einer mehr als 10 mal höheren Konzentration als bei der Acetoinbildung.

Ferner wurde das Verhalten von 2,5-Dimethyl-4-amino-Pyrimidinsulfonsäure gegenüber Pyruvatdehydrogenase und Thiaminpyrophosphokinase untersucht. Es zeigte sich, dass diese Verbindung die Acetoinbildung nicht beeinflusste. Gegenüber Thiaminpyrophosphokinase hatte sie - allerdings erst in sehr hoher Konzentration - eine Hemmwirkung gezeigt.

6.2 In vivo-Experimente

Bei chronischer i.p. Verabreichung von 2,5-Dimethyl-4-aminopyrimidinsulfonsäure an vollernährten Ratten konnte keine Veränderung der Pyruvatdehydrogenaseaktivität im Herzmuskelhomogenat beobachtet werden, während Sulfit eine deutliche Verminderung des Enzyms bewirkte.

Bei Thiaminmangelratten ergab eine chronische Applikation von Sulfit per Schlundsonde ebenfalls eine Erniedrigung der Pyruvatdehydrogenaseaktivität. Dagegen zeigte die Lipoamiddehydrogenase eine deutliche Aktivitätssteigerung.

Eine einmalige i.p. Injektion von Sulfit (320 mg/kg Körpergewicht) an vollernährte Ratten führte nach 2 Stunden zu einer geringfügigen Abnahme der Pyruvatdehydrogenase- und Transketolaseaktivität, während Malatdehydrogenase und Lipoamiddehydrogenase unverändert blieben. In höherer Dosierung (400 mg/kg Körpergewicht) dagegen bewirkte eine einmalige i.p. Injektion von Sulfit sowohl bei vollernährten als auch bei Thiaminmangelratten eine signifikante Verminderung der Pyruvatdehydrogenase und der Lipoamiddehydrogenaseaktivitäten.

Diese Verminderung war bei den Thiaminmangelratten bereits 1 Stunde nach der Applikation nachweisbar, bei den vollernährten Tieren dagegen erst nach 2 Stunden. Bei den Thiaminmangelratten konnte 2 Stunden nach der Sulfitinjektion schon ein Wiederanstieg der Lipoamiddehydrogenaseaktivität beobachtet werden.

Anhang: Methoden

7. Anreicherung von Enzymen

7.1 Darstellung der Pyruvatdehydrogenase aus Schweineherzen

7.1.1 Methode nach KORKES et al. (1952), DAWSON et al. (1960) und HOLZER et al. (1961)

Frische Schweineherzen wurden von Fett und Bindegewebe sowie Blutgerinseln befreit, in Stücke geschnitten, zwei Stunden bei -20°C gefroren und im Fleischwolf zerkleinert. Der Brei wurde mit fünf Volumina kaltem destilliertem Wasser zweimal gewaschen und zentrifugiert. Das Sediment wurde bei -20°C eingefroren. 105 g gefrorener Brei wurden mit 350 ml kaltem 0,02 M Phosphatpuffer pH 7,0 im Starmix homogenisiert. Das Homogenat ließ man 30 min. im Eisbad stehen und zentrifugierte dann 20 min. bei 0°C und 4500 x g. Das Sediment wurde mit 120 ml 0,02 M Phosphatpuffer pH 7,0 gewaschen und zentrifugiert. Die beiden Überstände wurden vereinigt (420 ml) und mit 102,9 g feingepulvertem Ammoniumsulfat (35 % Sättigung) versetzt. Das gefällte Protein wurde 30 min. bei 6500 x g und 0°C abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 60 ml 0,02 M Phosphatpuffer pH 7,0 suspendiert, 48 Stunden eingefroren und während dieser Zeit zweimal aufgetaut. Nach Abzentrifugieren des denaturierten Proteins wurde der Überstand auf 100 ml mit Puffer aufgefüllt und auf 0°C abgekühlt. Zu diesem Überstand wurde 50 ml Äthanol (96 %) von -15°C langsam hinzugefügt. Die Suspension wurde halbgefroren und anschließend zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 20 ml 0,002 M Phosphatpuffer pH 6,0 aufgenommen und ein bis zwei Stunden lang "geplümpert". Das Sediment wurde abzentrifugiert und bei -20°C aufbewahrt.

Die Bestimmung des Proteins erfolgte mit Hilfe der Biuret-

methode in einer Modifikation nach ULLRICH (1968).
Tabelle 23 zeigt die Ausbeute an gereinigtem Enzym.

Tabelle 23: Anreicherung von Pyruvatdehydrogenase aus
Schweineherzmuskel. Bestimmung des Enzyms
mit Hilfe der Acetoinmethode. Spezifische Ak-
tivität: mcg Diacetyl / mg Protein / Stunde
= Enzymeinheit

Reinigungsstufe	Enzymeinheit	Einheiten im Gesamtansatz	Ausbeute %
Phosphatextrakt	0,409	5.35×10^3	100
Ammoniumsulfat- fällung	20,60	3.43×10^3	64,40
Äthanol-fällung	20,9	6.5×10^2	6,50

7.1.2 Methode nach SANADI, LITTLEFIELD und BOCK (1952) und HAYAKAWA et al. (1966)

Für die Bestimmung des gesamten Pyruvatdehydrogenasekom-
plexes wurde eine andere Anreicherung der Pyruvatdehydroge-
nase aus Schweineherz durchgeführt: 330 g gefrorener Brei
wurde mit 1,5 l 0,05 M Phosphatpuffer pH 7,0 im Starmix
homogenisiert. Nach 30 min. wurde das Homogenat zentrifu-
giert. Der pH-Wert des Rohextrakts wurde durch Zugabe von
10 %iger kalter Essigsäure, die tropfenweise unter Umrühren
zugesetzt wurde, auf 4,6 eingestellt. Dann wurde 30 min.
bei 4500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen,
der Niederschlag in 100 ml 0,1 M phosphatpuffer pH 7,0 auf-
genommen und danach durch Zusatz von 1 N NaOH auf pH 6,5
eingestellt. Die grobe Suspension wurde sodann in einem
Glas-Homogenisator fein verteilt und mehrmals bei -15°C
eingefroren und wieder aufgetaut. Das denaturierte Protein
wurde abzentrifugiert. Zu 100 ml des Überstandes wurde 1 ml

einer 2 % Protaminsulfat-Lösung unter Rühren langsam zugegeben und der Niederschlag abzentrifugiert. Zum Überstand wurden weitere 0,5 ml 2 % Protaminsulfatlösung zugegeben. Nach 30 min. Zentrifugieren wurde der Niederschlag verworfen und nochmals 2,0 ml Protaminsulfatlösung zum Überstand zugegeben. Der Rückstand wurde hochtourig abzentrifugiert, in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,0 aufgenommen und 30 min "geplümpert". Die unlöslichen Proteine wurden durch Zentrifugieren abgetrennt, und die klare Enzymlösung wurde über Nacht gegen 500 ml 0,05 M Phosphatpuffer pH 7,0 dialysiert. Nach nochmaligem Zentrifugieren wurde eine klare Lösung erhalten (20 min. bei 16000 x g), welche bei -20°C aufbewahrt wurde.

7.2 Herstellung von Pyruvat-Decarboxylase (PDC) aus Bierhefe

Methode nach HOLZER et al. (1956) und ULLRICH et al. (1966).

Macerationssaft: 600 g luftgetrocknete Bierhefe wurden unter Rühren portionsweise in eine Lösung von 2 l Wasser, 100 ml Glycerin, 1 g EDTA-Na₂ und 6 g Ammoniumsulfat gerührt. Der homogene Schlamm wurde über Nacht bei ca. 25° C stehen gelassen und dann nochmals gut durchgemischt und scharf abzentrifugiert. Die Weiterverarbeitung des Überstandes erfolgte bei 0° ± 3° C.

Acetonfraktionierung: Zu 1800 ml eisgekühltem Macerationssaft wurden unter Rühren innerhalb von 15 Minuten 1062 ml Aceton von -15° C zugegeben. Nach ein bis zwei Stunden wurde scharf abzentrifugiert, der Überstand (2350 ml) mit weiterem Aceton (352,5 ml) versetzt und sofort bei 2000-3000 x g abzentrifugiert. Das Sediment wurde unmittelbar danach in 500 ml Phosphatpuffer pH 6,8 suspendiert, nach Zusatz von je 10 ml TPP- und MgSO₄-Lösung sowie 0,1 g EDTA-Na₂ zwei Stunden lang unter gelegentlichem Umrühren stehen ge-

lassen und anschließend scharf abzentrifugiert.

Ammoniumsulfatfraktionierung: In je 10 ml Überstand wurden 40 g Ammoniumsulfat eingeführt. Das ausgefällte Protein wurde bei 3000 x g abzentrifugiert und mit 300 ml 2,7 M Ammoniumsulfatlösung gewaschen. Anschließend wurde das Sediment zwei Stunden lang unter gelegentlichem "Plümpern" mit 300 ml 2,2 M Ammoniumsulfatlösung gewaschen, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Aus dem Sediment wurde nun die Hauptmenge an PDC mit 300 ml 1,8 M Ammoniumsulfat herausgelöst und der Rückstand scharf abzentrifugiert. Die aus dem so erhaltenen Überstand mit 8 g Ammoniumsulfat je 100 ml gefällte "vorgereinigte" PDC wurde sehr scharf abzentrifugiert und bei 0° eingefroren. Sie war monatelang haltbar. Die Ausbeute betrug 10 bis 25 g einer leicht geleblichen, amorphen Masse.

7.2.1. Herstellung von Apopyruvatdecarboxylase (Apo PDC) aus PDC. HOLZER u. GOEDDE (1957)

Alle Operationen erfolgten bei 0°. Eine Lösung von 2,9 g Holo-PDC-Paste in 1,1 ml dest. Wasser wurde in 100 ml Phosphatpuffer pH 8,9 gegossen. Nach 30 min. Stehen wurden innerhalb von 20 Minuten 45 g Ammoniumsulfat eingerührt; dabei wurde gleichzeitig durch tropfenweise Zugabe von 12,5 %igem Ammoniak der pH-Wert auf 8,6 - 8,8 gehalten. Der Niederschlag wurde bei 3000 x g abzentrifugiert, zweimal mit Ammoniumsulfatlösung (2,7 M) vom pH 8,6 - 8,8 und zweimal mit gewöhnlicher Ammoniumsulfatlösung gewaschen. Zuletzt wurde sehr scharf abzentrifugiert. Die spezifische Aktivität war meistens geringer als die der ursprünglichen Holo-PDC. Die Apopyruvatdecarboxylase ist bei -20° nur wenige Tage ohne Aktivitätsverlust haltbar und denaturiert in Lösung bei 0° schon innerhalb weniger Stunden.

7.3 Herstellung der Arylaminacetyltransferase aus Taubenlebern (TABOR et al., 1953)

Drei Taubenlebern wurden mit dem zehnfachen Volumen eiskaltem Aceton homogenisiert und auf einer Filternutsche abgesaugt. Der Rückstand wurde mit eiskaltem Aceton gewaschen und an der Luft getrocknet. 6 g dieses Acetonpulvers wurden mit 60 ml bidest. Wasser in einem Mörser bei Zimmertemperatur 10 - 15 Minuten lang gründlich verrieben und anschließend bei 20 000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Wasser zu 96 ml aufgefüllt, langsam mit kaltem Aceton (76 ml) versetzt und anschließend zentrifugiert. Zum Überstand wurden weitere 193 ml Aceton hinzugegeben. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und in wenig bidest. Wasser aufgenommen. Das erhaltene Enzympräparat wurde in kleinen Portionen bei -15°C aufbewahrt. Diese Enzymlösung enthielt 29,52 mg Protein pro ml.

7.4 Herstellung von Thiaminpyrophosphokinase aus Rattenlebern (LEUTHART u. NIELSON, 1952)

Rattenlebern wurden in kaltem Aceton homogenisiert und auf einer Filternutsche abgesaugt. Der Niederschlag wurde mit weiterem Aceton gewaschen und an der Luft getrocknet. 1 g des Pulvers wurde mit 30 ml destilliertem Wasser in einem Mörser verrieben und der Extrakt zentrifugiert. Das Extrakt wurde mit 15 ml gesättigter Ammoniumsulfatlösung bis zu einer 1/3-Endkonzentration versetzt. Der Niederschlag wurde durch Zentrifugieren abgetrennt und anschließend die Ammoniumsulfat-Konzentration auf 1/2 Sättigung gebracht. Nach einigen Minuten wurde die Suspension zentrifugiert und der Niederschlag in 10 ml 0,05 M Phosphatpuffer pH 6,2 gelöst, 50 ml bidest. Wasser zugegeben und nochmals 30 ml gesättigte Ammoniumsulfatlösung hinzugefügt. Die Lösung wurde auf -5° abgekühlt und mit 30 ml 0,1 M HCl (mit Ammoniumsulfat gemischt, um eine Endkonzentration

von 1/3 Sättigung zu erreichen) rasch unter Schütteln versetzt. Der entstandene Niederschlag wurde bei 0°C abzentrifugiert und mit 20 ml 3/4 gesättigter Ammoniumsulfatlösung gewaschen und in 0,05 M Phosphatpuffer von pH 6,2 aufgelöst. Die denaturierten Proteine wurden durch Zentrifugieren abgetrennt. Das Enzym wurde jeweils bei Bedarf aus Acetontrockenpulver frisch hergestellt.

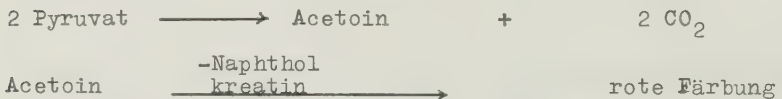
8. Bestimmung der Enzymaktivitäten

8.1 Bestimmung der Pyruvatdehydrogenase: Acetoin-Methode

Nach dem Verfahren von HOLZER u. GOEDDE (1957b) und SCRIBA u. HOLZER (1961).

Pyruvatdehydrogenase katalysiert die Reaktionen:

- (1) $2 \text{ Pyruvat} + 2 \text{ TPP} \rightarrow 2,2-(\alpha\text{-Carboxy-}\alpha\text{-Hydroxyäthyl})\text{-TPP}$
- (2) $2,2-(\alpha\text{-Carboxy-}\alpha\text{-Hydroxyäthyl})\text{-TPP} \rightarrow 2,2-(\alpha\text{-Hydroxyäthyl})\text{-TPP} + 2 \text{ CO}_2$
- (3) $2-(\alpha\text{-Hydroxyäthyl})\text{-TPP} \rightarrow \text{Acetaldehyd} + \text{TPP}$
- (4) $2-(\alpha\text{-Hydroxyäthyl})\text{-TPP} + \text{Acetaldehyd} \rightarrow \text{Acetoin} + \text{TPP}$



(WESTERFELD, 1945).

Der Testansatz enthielt:

- | | | | |
|--------|----------|--|--------|
| 1,0 ml | 0,15 M | KH ₂ PO ₄ -Puffer | pH 6,0 |
| 0,1 ml | 0,0327 M | Pyruvat | |
| 0,1 ml | 1,0 M | Acetaldehyd | |
| 0,1 ml | 0,01 M | Thiaminpyrophosphat | |
| 0,1 ml | 0,02 M | MgSO ₄ | |
| 0,2 ml | | Homogenat oder Alkohol-Fraktion von Pyruvat- | |
| | | oxydase variiert nach Verbrauch. | |
| 1,4 ml | | Aqua dest. - immer ad 3 ml | |

Nach einer Inkubationszeit von 30 min. bei 37°C wurde die Reaktion mit je 1 ml folgender Lösungen abgestoppt: 5 %ige ZnSO_4 und 0,05 %ige NaOH. Der Niederschlag wurde 10 Minuten bei 3000 Rpm abzentrifugiert und der Überstand mit Aqua dest. auf 5 ml aufgefüllt. Es wurde 1 ml einer 5 %igen α -Naphthollösung in 2,5 M NaOH und 1 ml einer 0,5 % Kreatinlösung hinzugefügt und nach 1 h die Extinktion bei 546 nm gemessen. Die spezifische Aktivität wurde in mcg Diacetyl / mg Protein / Stunde angegeben, da die Eichkurve mit Diacetyl und nicht mit Acetoin aufgestellt worden war.

Die Pyruvatdehydrogenase hatte unter diesen Bedingungen ein pH-Optimum von 6 (siehe Abb. 3).

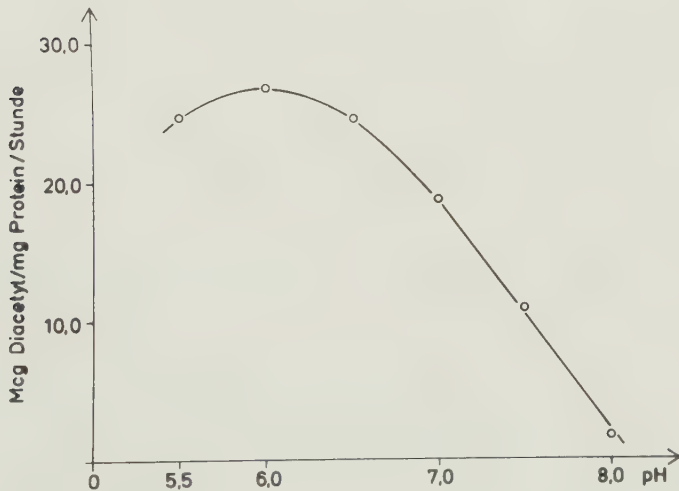


Abb. 3: Pyruvatdehydrogenaseaktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert
(Die Aktivitätsbestimmung erfolgte mit Acetaldehyd als Cosubstrat)

Abb. 4 zeigt die Abhängigkeit der Syntheserate des Enzyms von verschiedenen Mengen an Protein. Als Enzymquelle diente die Äthanol-Fraktion von Schweineherzhomogenat.

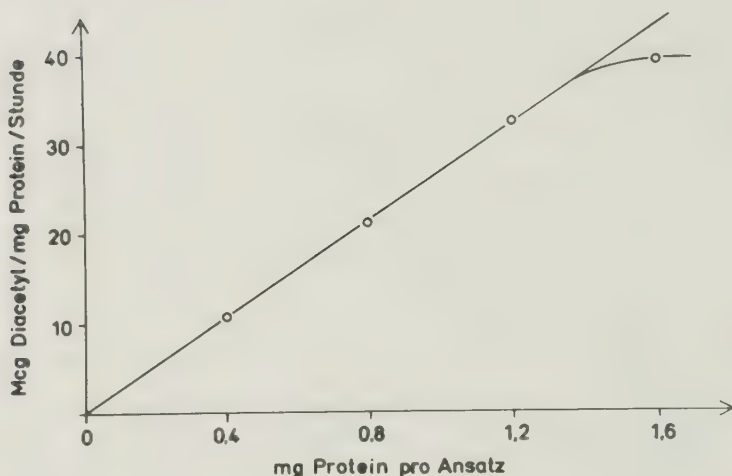


Abb. 4: Abhängigkeit der Acetoinsynthese von der Proteinmenge. (Die Aktivitätsbest. erfolge mit Acetaldehyd als Cosubstrat)

Die Ergebnisse zeigen, daß die Acetoinbildung bis zu einer Menge von 1,2 mg Protein pro Ansatz linear verläuft. Durch Kontrollversuche (Inkubation der Testprobe einmal ohne Enzym und einmal ohne Substrat) wurde weiterhin sichergestellt, daß eine nichtenzymantische Synthese von Acetoin unter den gewählten Versuchsbedingungen praktisch nicht erfolgt. In weiteren Versuchen wurde festgestellt, daß die enzymatische Acetoinbildung innerhalb von 60 Minuten linear verläuft (siehe Abb. 5).

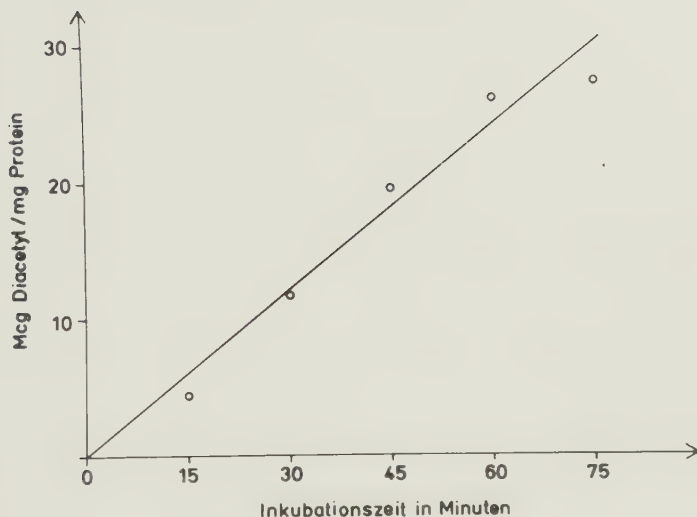


Abb. 5: Pyruvatdehydrogenaseaktivität in Abhängigkeit von der Zeit (Die Aktivitätsbestimmung erfolgte mit Acetaldehyd als Cosubstrat).

Später wird die Reaktionsgeschwindigkeit langsamer - entweder aufgrund einer Enzyminaktivierung oder weil die Sättigungskonzentration an Substrat nach längerer Inkubation unterschritten wird. Es wurde daher bei den Aktivitätsbestimmungen, bei denen nur Pyruvat als Substrat diente, eine Inkubationszeit von 60 Minuten gewählt. Wurde Acetaldehyd als Cosubstrat verwandt, wurde nur 30 Minuten inkubiert, weil hierbei sehr viel größere Mengen an Acetoin gebildet werden.

Bei der Bestimmung der Pyruvatdehydrogenaseaktivität in Abhängigkeit von der Substratmenge ergab sich, daß die Substratsättigung für Pyruvat bei einer Konzentration von

10.9×10^{-4} M praktisch gewährleistet ist (siehe Abb. 6).

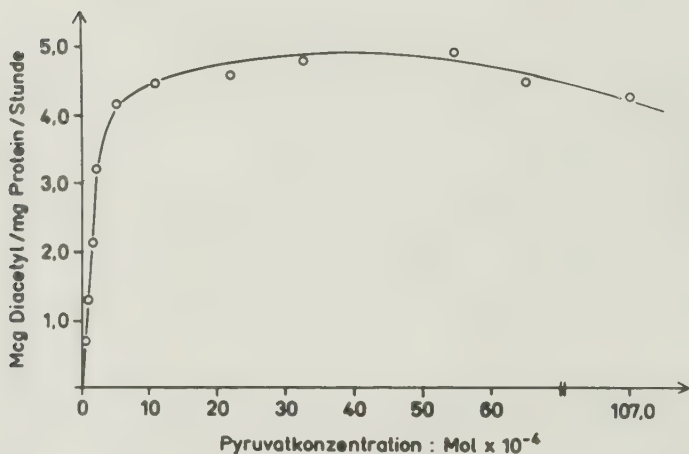


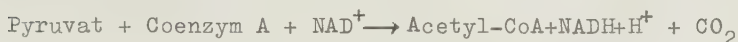
Abb. 6: Substratsättigungskurve für Pyruvatdehydrogenase (Die Aktivitätsbest. erfolgte ohne Acetaldehyd als Cosubstrat).

Für in vitro-Hemmversuche wurde mit dieser Pyruvatsättigungskonzentration, ohne Acetaldehyd als Cosubstrat, gearbeitet.

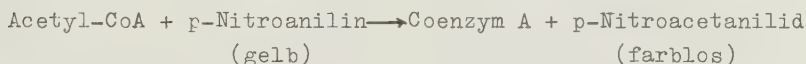
Bei den in vivo-Versuchen zur Bestimmung der Pyruvatdehydrogenase in Rattenherzhomogenaten wurde die gleiche Pyruvatsättigungskonzentration aber zusätzlich Acetaldehyd als Cosubstrat verwandt.

8.2 Bestimmung der Pyruvatdehydrogenase (optische Methode.
Nach LYNEN, 1954; HOLZER und GOEDDE, 1957)

Prinzip: Pyruvatdehydrogenase katalysiert die folgende Reaktion:



Die Bestimmung des Acetyl-Coenzym A erfolgte enzymatisch mit Hilfe von Arylaminacetyltransferase, dabei wird gelbes p-Nitroanilin in farbloses p-Nitroacetanilid übergeführt.



Die Abnahme der Farbintensität von p-Nitroanilin wurde bei 405 nm verfolgt; sie ist unter den gewählten Bedingungen ein Maß für die Pyruvatdehydrogenaseaktivität.

Der Testansatz enthielt:

0,5 ml	0,4	M Tris-Puffer pH 7,4
0,1 ml	0,002	M NAD ⁺
0,1 ml	0,02	M Cystein · HCl
0,1 ml	0,001	M Coenzym A
0,1 ml		Arylamintransacetylase 29,5 mg Protein/ml
0,1 ml	0,02	M Thiaminpyrophosphat
0,1 ml	0,15	M MgSO ₄
0,1 ml		Lactat-dehydrogenase 5 mg/ml
0,1 ml	0,002	M p-Nitroanilin
0,2 ml		a) bei in vitro-Versuchen Protamin-Eluat-Fraktion von Pyruvatoxydase, oder bei
		b) Rohextrakt. Volumen verändert nach Verbrauch.
H ₂ O		ad 2 ml Gesamtvolumen.

Die enzymatische Reaktion wurde mit 0,1 ml einer 4×10^{-3} M Pyruvatlösung gestartet. Die Reaktion wurde bei 25°C durchgeführt. Die spezifische Aktivität ist angegeben in $\Delta E / \text{min} / \text{mg Protein}$.

Die enzymatische Reaktion verläuft unter diesen Bedingungen innerhalb von zehn Minuten linear (Abb. 7).

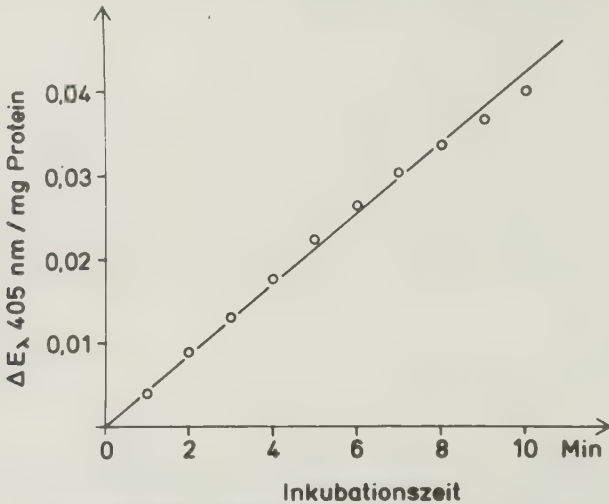


Abb. 7: Pyruvatdehydrogenaseaktivität in Abhängigkeit von der Zeit

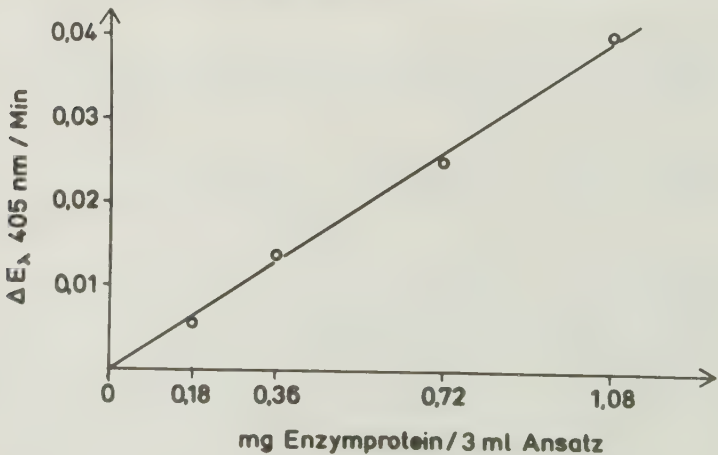


Abb. 8: Pyruvatdehydrogenaseaktivität in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration.

In einem Bereich von 0,13 bis 1,03 mg Protein pro Ansatz war die Reaktionsgeschwindigkeit der Enzymreaktion proportional der eingesetzten Proteinmenge (Abb. 3).

8.3 Bestimmung der Thiaminpyrophosphokinase (E.C. 2.8.3.1) CERECEDO, 1954)

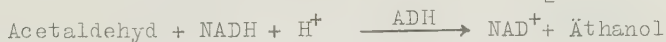
Der Testansatz enthält:

1,0 ml	0,5 M K_2HPO_4 -Puffer pH 7,5
0,1 ml	0,017 M $MgSO_4$
0,1 ml	$3,27 \times 10^{-5}$ M Thiamin (Proteinmenge zwischen 1,4 und 4 mg pro Ansatz)
0,5 ml	HCl-Fraktion von Rattenleber
0,1 ml	0,045 M ATP
H_2O	ad 3 ml Gesamtvolumen

Die Reaktionsmischung wurde eine Stunde inkubiert und die Reaktion anschließend durch kurzes Erhitzen des Ansatzes im Wasserbad gestoppt, kurz gekühlt und zentrifugiert.

Das gebildete Thiaminpyrophosphat wurde mit Hilfe einer Methode nach HOLZER et al. (1956) bestimmt.

Prinzip: $TTP + A_1 \rightarrow Holo-PDC$



Die Geschwindigkeit der NADH-Abnahme wurde photometrisch bei 366 nm verfolgt; sie ist der Thiaminpyrophosphatkonzentration direkt proportional.

Der Testansatz enthielt:

0,04 ml	Apo-PDC-Lösung 3,7 mg/ml
0,01 ml	0,02 M $MgSO_4$
0,10 ml	TPP-Frohelslösung
0,1 ml	NADH (40 mg/ml)

0,1 ml	ADH-Lösung 0,017 mg/ml (Alkoholdehydrogenase)
1,0 ml 0,3 M	Citratpuffer pH 6,0
1,55 ml	Aqua dest.

Die Apo PDC wurde zunächst mit TPP-Probelösung und MgSO_4 30 Minuten lang bei Zimmertemperatur in der Küvette inkubiert, dann wurden die anderen Lösungen zugegeben. Nach einigen Minuten Kontrolle der Extinktion bei 366 nm zur Bestimmung des Blindwertes wurde die Reaktion mit 0,1 ml einer 1 M Pyruvatlösung gestartet. Die Extinktion wurde bei 366 nm im Abstand von 1 Minute abgelesen. Zum Überprüfen der Methode wurde zunächst die TPP-Kinaseaktivität in Abhängigkeit von Zeit, Enzymmenge und bei verschiedenen Substratkonzentrationen untersucht. Die Ergebnisse sind graphisch in den Abbildungen 9, 10 und 11 dargestellt.

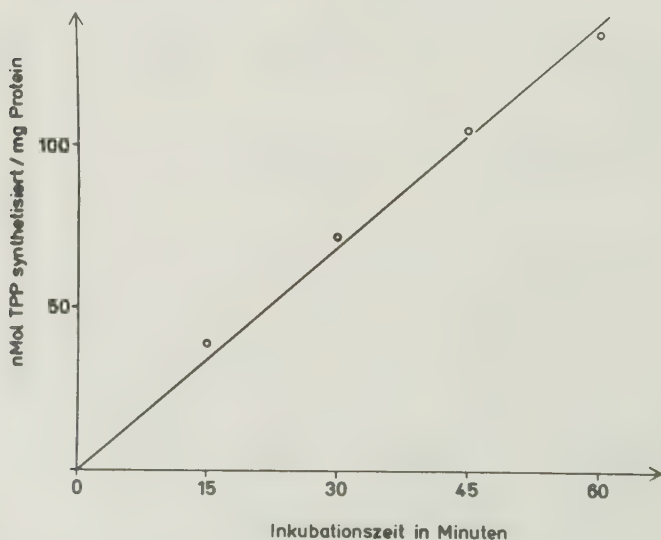


Abb. 9: Thiaminpyrophosphokinaseaktivität: TPP-Umsatz in Abhängigkeit von der Zeit

Die Bildung von TPP verläuft bei einem Proteingehalt von ca. 25 mg/3 ml Ansatz 60 Minuten lang linear (Abb. 9).

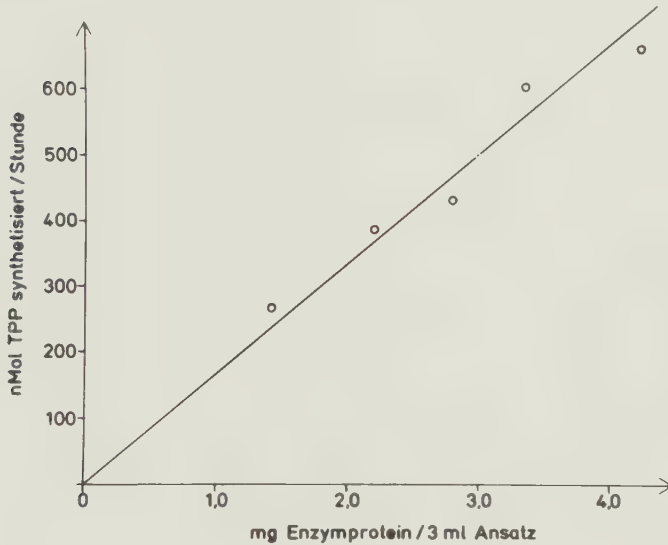


Abb. 10: Thiaminpyrophosphokinaseaktivität: Abhängigkeit der TPP-Synthese von der Enzymmenge.

Aus Abb. 10 ist ersichtlich, daß ebenfalls eine lineare Beziehung zwischen der Reaktionsgeschwindigkeit und der Konzentration an eingesetztem Enzymprotein besteht.

Bei der Bestimmung der Thiaminpyrophosphokinaseaktivität mit variierenden Substratkonzentrationen ergab sich, daß die Substratsättigung für Thiamin bei Konzentrationen zwischen 10 und 16×10^{-7} M lag.

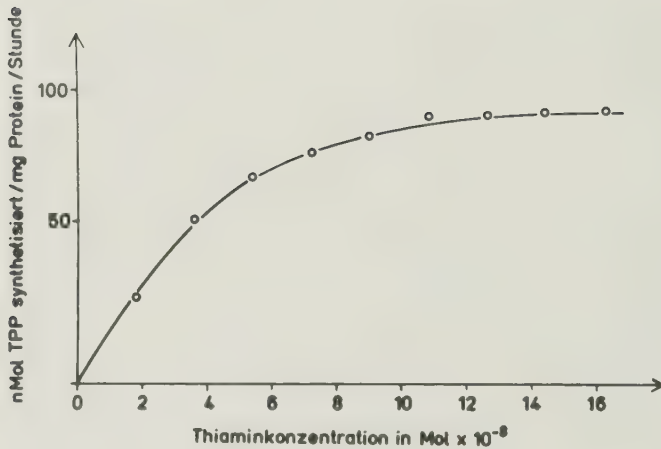


Abb. 11: Substratsättigungskurve für TPP-kinase.

8.4 Bestimmung der Transketolase (SCHOUTEN, v. EPS u. BOUDIER (1964))

Prinzip: Transketolase katalysiert die Synthese von Sedoheptulose-7-phosphat aus Ribose-5-phosphat. Das gebildete Sedoheptulose-7-phosphat wird mit Cystein in saurem Milieu umgesetzt und die entstandene rosa Färbung photometrisch bei 510 (Absorptionsmaximum) und 540 nm (Absorptionsminimum) gemessen.

Regentien:

- 0,015 M Ribose-5-phosphat pH 7.3
- 0,002 M Thiaminpyrophosphat (TPP) in "Puffergemisch"
- K_2HPO_4 -Puffer: 17,5 g KH_2PO_4 in Aqua dest.
gelöst. Mit ca. 20 ml 1 M HCl an der Elektrode
auf pH 7,4 eingestellt und mit Wasser auf
1000 ml aufgefüllt.
- 3 % Cystein-HCl
- "Puffergemisch":
103 Teile 1,15 %iger KCl
1 Teil 3,82 %iger $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$
20 Teile K_2HPO_4 -Puffer
- 15 %ige Trichloressigsäure (TCE)
- verd. Schwefelsäure:
5,6 Teile Aqua dest.
14,1 Teile Schwefelsäure
- 4 μ Mol/ml Sedoheptulose-anhydridmonohydrat (Standard-
lösung)

Blut-, Standard- und Blindprobe wurden nach folgendem Schema
3 umgesetzt:

Schema 3

	Blind- probe	Standard- probe	Transketolase-Probe	
			ohne TPP	mit TPP
TPP in Puffer- gemisch	-	-	-	0,2
Puffergemisch	0,2	0,2	0,2	
Vollblut	0,2	-	0,2	0,2
Standard- lösung	-	0,2	-	-

Die Proben wurden über Nacht tiefgefroren und durch 30 min. Inkubieren bei 37°C aufgetaut. Anschließend wurde das Protein der Blindprobe mit 0,4 ml TCE ausgefällt. Zu jeder Probe wurden 0,4 ml Ribosephosphatlösung (Substrat) zugegeben und nochmals 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Reaktion der Standard- und Transketolaseproben mit 0,4 ml TCE abgestoppt und alle Proben 15 Minuten bei 4000 Rpm zentrifugiert. 0,3 ml jedes Überstandes wurden in Reagenzgläser mit verd. Schwefelsäure auf 10 ml aufgefüllt, gut gemischt und vier Minuten lang im kochenden Wasserbad erhitzt. Danach wurde auf Zimmertemperatur abgekühlt, mit 0,3 ml Cysteinlösung versetzt, nochmals gut gemischt und über Nacht stehen gelassen. Die Farbbintensität wurde photometrisch bestimmt. Die Transketolaseaktivität wurde in μMol gebildetes Sedoheptulose-7-phosphat pro Minute pro Liter Blut angegeben.

Berechnung:

Die Berechnung erfolgte ebenfalls nach der Formel von SCHOUTEN, v. EPS und BOUDIER.

$$\text{Transketolase-} = \frac{1000 \times \Delta E \text{ Testprobe}}{\Delta E \text{ Standard}} \times \frac{\text{Konzentration von Standard}}{30} \times \frac{35}{\text{Hct}}$$

aktivität

ΔE = Differenz der Extinktionen bei 510 und 540 nm

30 = Inkubationszeit in Minuten

Hct = Hämatokritwert des Blutes.

8.5 Bestimmung der Lipoamid-dehydrogenase (HAYAKAWA et al. 1966)

Die Bestimmung der Lipoamid-Dehydrogenase erfolgte im optischen Test gemäß Gl. 1, wobei die Abnahme der NADH-Extinktion ein Maß für die Enzymaktivität ist.



Ansatz:

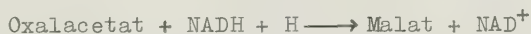
0,1 ml	NADH 5 mg/ml
0,1 ml	Äthylendiamintetraacetat 9,3 mg/ml
0,03 ml	Lipoamid 6,568 mg/ml in 96 % EtOH
1,0 ml 1M	Kaliumphosphatpuffer pH 6,5
0,67 ml	Aqua dest.

Die Lösungen wurden nacheinander in 10 mm Küvetten pipettiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 0,1 ml Herzmuskelhomogenat gestartet und die Extinktionsabnahme bei 366 nm im Eppendorf-Photometer im Abstand von 1 Minute abgelesen.

Die Lipoamid-dehydrogenase-Aktivität wird in ΔE pro mg Protein pro Sekunde angegeben.

8.6 Bestimmung der Malat-Dehydrogenase (BOEHRINGER-Information, Test MDH 0485)

Prinzip: Malat-Dehydrogenase katalysiert die folgende Reaktion:



Der NADH-Verbrauch pro Zeiteinheit ist die Meßgröße.

Ansatz:

2,70 ml 0,1 M	Kaliumphosphatpuffer pH 7,5
0,1 ml	Oxallessigsäure (2 mg/ml, frisch gelöst)
0,1 ml	NAD 5 mg/ml

Die Lösungen wurden nacheinander in 10 mm Küvetten pipettiert und mit 0,1 ml Homogenat versetzt.

Die Aktivität der Malat-Dehydrogenase wird als ΔE pro mg Protein pro Sekunde angegeben.

9. Tiermaterial und Tierhaltung

Als Versuchstiere fanden männliche Wistar-Ratten aus einer gewerblichen Zucht Verwendung. Nach einer kurzen Eingewöhnungsperiode wurden die Tiere in Einzelkäfigen untergebracht. Die Tiere wurden im klimatisierten und gleichmäßig ausgeleuchteten Stall gehalten. Futter und Trinkwasser wurden ad libitum verabreicht, wobei jedoch die Futteraufnahme erfaßt wurde. Das Körpergewicht wurde alle zwei Tage für jedes Tier einzeln ermittelt. Die Tiere erhielten eine halbsynthetische Kost, deren Zusammensetzung in Abschnitt 10 beschrieben ist.

9.1 Organgewinnung und Homogenatherstellung

Die Ratten wurden durch Dekapitation getötet und die Herzen entnommen und gewogen. Die Homogenisation des Gewebes erfolgte im Starmix in 2 bis 5 ml 0,01 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0. Die Homogenate wurden 30 min. bei 0°C stehengelassen und anschliessend bei 3000 Rpm zentrifugiert.

9.2 Zusammensetzung der Versuchskost

Die Versuchskoste wurde nach HÖTZEL (1962) unter Berücksichtigung des Nährstoffbedarfs der Ratte zusammengestellt. Das Grundfutter bestand aus folgenden Substanzen:

- 60,0 g Rohrzucker, gemahlen
- 20,0 g Casein (vitaminfrei)
- 7,0 g Butterfett, gereinigt (vitaminiert mit Vit.A, D, E)
- 4,0 g Mineralstoffmischung (KSP XIII, flüssig)
- 0,2 g Methionin
- 0,2 g Cholinchlorid in 0,8 g Reisstärke
- 5,8 g Reisstärke

In 7 g Butterfett: 1000 I.E. Vitamin A (als Polinitat)
130 I.E. Vitamin D (als D₃), 10 mg DL- α -Tocopherolacetat

Die Vitaminmischung hatte die folgende Zusammensetzung:

Tabelle 24: Zusammensetzung der Vitaminmischung

Vitamine	pro 100 g Futter
Thiamin ¹⁾	0,5 mg
Riboflavin	1,0 mg
Pyridoxin	0,5 mg
Pantothensäure	5,0 mg
Inosit	40,0 mg
Cobalamin	2,0 mcg
Nicotinamid	10,0 mg
p-Aminobenzoesäure	10,0 mg
Biotin	0,03 mg
Folsäure	0,5 mg
Menadion	1,0 mg
Ascorbinsäure	18,0 mg

- 1) Bei einer Thiaminmangel-Kost wurde Thiamin ganz oder teilweise weggelassen

4.843 oder 3.893 mg der so hergestellten Vitaminmischung wurden in 2 g Reisstärke eingerührt und zu 98 Grundfutter gegeben. Das Futter wurde dann maschinell gemischt.

10. Enzymnomenklatur und Kennziffern¹⁾

Alkohol-dehydrogenase (ADH, 1.1.1.1)

Malatdehydrogenase = MDH (1.1.1.36)

Pyruvatdehydrogenase (1.2.4.1)

Lipoamid-dehydrogenase (1.6.4.3)

Arylaminacetyltransferase (2.3.1.5)

Thiaminpyrophosphokinase (2.7.6.2)

Transketolase (2.2.1.1)

1) Enzym Nomenclature. Recommendations (1964) of the
International Union of Biochemistry. Elsevier Publ.
Co Amsterdam 1965

11. Literaturverzeichnis

- Aira, K. J. Bact. 77, 630 (1959)
McElroy, W.D.
- Azari, P. Arch. Biochem. Biophys. 115, 230
(1966)
- Baghat, B. Forsch. Cosmet. Pharmacol 2, 1 (1964)
Lockett, M.F.
- Balabaeva, L. Cesk Hyg. 13, 23 (1968)
- Bennett, C. D. J. Neurochem. 13, 449 (1964)
Jones, J. H.
Nelson, J.
- Bennett, E. P. J. Biol. Chem. 241, 3409 (1966)
Massey, V.
- Brin, M. J. Am. Med. Ass., 187, 762 (1964)
- Brin, M. Am. J. Clin. Nutrit. 17, 240 (1965)
Dibble, M. V.
Peel, A.
McMullen, E.
Bourquin, A.
Chen, N.
- Buchman, E. R. J. Am. Chem. Soc. 57, 1848 (1935)
- Chmielmicka, J. Recz. panstw. Zakl. Hig 15, 13
(1964)
- Ciaccio, E. I. J. Biol. Chem. 241, 1581 (1966)
- Colio, L.G. J. Biol. Chem. 174, 405 (1948)
Babb, U.
- Dawson, J. Biochem. Z. 67, 456 (1957)
Hullin, R. P.
Walker, B. Z.
- Deus, B. Symposium über Vitaminaufnahme und
Blum, H. latente Vitaminmangelzustände, Mün-
Holzer, H. chen (1968)
- Dodson, K. S. Biochem. J. 61, 374 (1955)
Spencer, P.
Williams, K.

- Drefus, P. M. Am. J. Clin. Nutrit. 2, 414 (1961)
Victor, M.
- Eich, S. J. Biol. Chem. 207, 295 (1954)
Cerecedo, L. R.
- van Eys, J. Biochim. Biophys. Acta 27, 63 (1958)
Stolzenbach, F. E.
Scherwood, L.
Kaplan, N. O.
- Green, D. E. J. Biol. Chem. 145, 69 (1942)
Westerfeld, W. W.
Vennesland, B.
Knox, W. E.
- Gubler, C. J. J. Biol. Chem. 236, 3112 (1961)
- Gubler, C. J. J. of Nutrit. 77, 332 (1962)
Bethshold, G. E.
- Gubler, C. J. Biochim. Biophys. Acta 156, 85 (1968)
Johnson, L. R.
- Hayakawa, T. J. Biol. Chem. 241, 4694 (1966)
Hirashima, M.
Ide, S.
Hamada, M.
Okabe, M.
Koike, M.
- Heitze, K. Lebensmittel-Untersuch. Hyg 3, 60
(1961)
- Hennig, K. Lebensmittel Rdsch. 58, 315 (1962)
- Hermus, J. J. Internat.-J. Vit. Res. 39, 176 (1969)
- Heydenreich, G. A. Z. Ernähr.-Wiss. 8, 44 (1967)
- Holzer, H. Biochem. Z. 329, 175 (1957) a
Goedde, H. W.
- Holzer, H. Biochem. Z. 329, 192 (1957) b
Goedde, H. W.
- Holzer, H. Biochem. Z. 327, 331 (1956)
Schultz, G.
Villard-Palasi, C.
Jüntgen-Sell, J.

- Lhöesi, C. A. J. de Pharmacie Belgique 12, 519 (1957)
Baumann, B.
Busse, M.
- Lhuissier, M. Bull. Acad. natl. Med. 150, 242 (1966)
Lhuissier, M. Cahiers Nutrit. Diet 2, 23 (1967)
Hugot, D.
Leclerc, J.
Causeret, J.
- Lockett, M. F. J. Pharmac. Pharmacol. 12, 488 (1960)
Natoff, I. L.
- Lockett, M. F. J. Pharmacol. 9, 605 (1957)
- Meyerhof, O. Biochem. Z. 297, 113 (1938)
Ohlmeyer, P.
Möhle, W.
- Monfoort, C. H. Biochim. Biophys. Acta 16, 219 (1955)
Monfoort, C. H. Arch. Internat. Physiol. 62, 571 (1954)
- Monikowski, C. Rev. Fermentat. Ind. aliment. 19, 113 (1964)
Chmielnicka, E.
- Morgan, A. F. J. Agric. Research 42, 35 (1931)
Morgan, A. F. J. Nutrit. 2, 369 (1935)
Kimmel, L.
Field, A.
Nickols, P. F.
- Morgan, A. F. Food Research 4, 217 (1939)
Nobels, H. L.
Wiens, A.
Marsh, G. L.
Winkler, A. J.
- Pfleiderer, G. Biochem. Z. 328, 187 (1956)
Jeckel, D.
Wieland, Th.
- Pfleiderer, G. Biochem. Z. 329, 104 (1957)
Jeckel, D.
Wieland, Th.
- Racker, E. J. Am. Chem. Soc. 75, 1010 (1953)
de la Haba, G.
Leder, I. G.

- Reddi, R. R. Food Technology 4, 63 (1950)
Esselen, W. B.
Feller, C. R.
- Reed, L. J. J. Biol. Chem. 192, 851 (1951)
de Busk, B. G.
Johnson, P. M.
Getzendaner, M. E.
- Rehm, H. J. Z. Lebensm.-Untersuch. u. Forschung
Wallnöfer, P. 127, 72 (1965)
Keskin, H.
- Reinauer, von Hans Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 349,
Grassow, G. 969 (1968)
Hollman, S.
- Roberts, E. Ann. Rev. Biochem. 32, 532 (1963)
Baxter, C. F.
- Sanadi, D. R. J. Biol. Chem. 197, 857 (1952)
Littlefield, J. W.
Bock, R. M.
- Schouten, H. Clin. Chim. Acta 10, 474 (1964)
van Eps, S.
Boudier, L. W.
- Singer, T. B. Biochim. Biophys. Acta 9, 316 (1952)
Pensky, J.
- Somogyi, M. J. Biol. Chem. 86, 655 (1930)
- Steyn-Parve, E. P. Thiamin Deficiency in Ciba Foundation
Study Group No. 28, Churchill Ltd.,
London (1967)
- Tabor, H. J. Biol. Chem. 204, 127 (1953)
Mehler, A. H.
Staman, E. R.
- Tanner, H. Mitt. Lebensmittel-Untersuch.-Hyg.
54, 2 (1963)
- Trager, J. M. Physiol. Plantarum. 9, 665 (1956)
Rautanen, N.
- Ullrich, J. persönliche Mitteilung (1968)
- Ullrich, J. Biochim. Biophys. Acta 113, 595
Wittorf, J. H. (1966)
Gubler, C. J.

- Wallnöfer, P. Lebensmittel-Untersuch. u. Forschung
127, 192 (1965)
- Warburg, O. Z. Naturforsch. 25b, 332 (1970)a
Geissler, A. W.
Lorenz, S.
- Warburg, O. Z. Naturforsch. 25b, 559 (1970)b
Geissler, A. W.
Lorenz, S.
- Westerfeld, W. W. J. Biol. Chem. 161, 495 (1945)
- Williams, R. R. J. Am. Chem. Soc. 57, 229 (1935)a
- Williams, R. R. J. Am. Chem. Soc. 57, 536 (1935)
Waterman, R. F.
Keresztesy, J. C.
Buchman, E. R.
- Wilmes, G. Proc. of Seventh Internat. Congr.
of Nutrit. 5, 541 Hamburg (1966)
- Wright, R. C. J. Biol. Chem. 206, 725 (1954)
Scott, E. M.
- Wyss, O. Adv. Food Res. 1, 373 (1948)

Ich danke meinem hochgeschätzten Doktorvater, Herrn Professor Dr. D. Hötzel, für seine stete Geduld und Freundlichkeit, für die Übernahme des Risikos meiner Promotion und seine Förderung.

Herrn Professor Dr. H. Linser möchte ich ebenfalls meinen Dank aussprechen, da er die Verantwortung als Coreferent trägt.

Für die Zusammenfassung meiner Arbeit danke ich Frau Dr. Bitsch, Herrn Professor Dr. D. Hötzel und Herrn Dr. Femi Obigbesau.

Meine wissenschaftliche Ausbildung verdanke ich den Damen und Herren Professoren und Dozenten:

Cremer, Hötzel, Holzer, Krisch, Linser, Rehner, Staudinger, Ullrich.

Lebenslauf

Ich, Jemima Ustane Laryea, wurde am 6. März 1939 als Tochter des Schulrats Michael Laryea und seiner Ehefrau Stella, geb. Buckman in Accra-Ghana geboren.

Von 1946 bis 1952 besuchte ich in Accra die Bishop's Girls' School, von 1953 bis 1957 die Achimota Sec. School, wo ich im December 1957 das Abschlußzeugnis erwarb.

1959 erhielt ich ein Stipendium, um am Bennett College North Carolina, USA, Chemie zu studieren. Dort beendete ich mein Studium im Juni 1963 mit dem Bachelor of Science (Bsc.).

Von September 1963 bis Juni 1965 studierte ich Biochemie an der Universität von Illinois, Chicago. Nach meinem Examen im Juni 1965 erhielt ich den Grad eines Master of Science und blieb noch bis August 1966 am dortigen Institut als Assistentin.

Im Wintersemester 1966/67 nahm ich als Doktorandin im Institut für Ernährungswissenschaft der Justus Liebig-Universität Giessen meine Tätigkeit auf.

Im Sommer 1970 legte ich das Doktorexamen ab.

